



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VLIV MAGNETICKÉHO POLE A DALŠÍCH
VYBRANÝCH STRESORŮ NA FYZIOLOGII
MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK**

THE EFFECT OF MAGNETIC FIELD AND OTHER SELECTED STRESSORS ON PHYSIOLOGY
OF BACTERIAL CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Mrázová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1278/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kateřina Mrázová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Vliv magnetického pole a dalších vybraných stresorů na fyziologii mikrobiálních buněk

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma diplomové práce
2. Experimentálně prostudovat vliv vybraných stresových faktorů na růst a fyziologii vybraných bakterií
3. Prostudovat vliv magnetického pole na bakteriální buňky.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kateřina Mrázová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá vlivem magnetického pole a organických látek, konkrétně benzenu a p-nitrofenolu, na buňky PHA produkující bakterie *Cupriavidus necator* H16 a mutantního kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, který polyhydroxyalkanoáty neprodukuje. Stacionární magnetické pole bylo vytvářeno jak pomocí permanentního magnetu, tak elektromagnetem. Vliv magnetického pole na růst buněk byl studován stanovením růstových křivek, kdy bylo zjištěno, že kultivace v magnetickém poli a minerálním médiu převážně inhibuje bakteriální růst. Dále byl sledován obsah polyhydroxyalkanoátů pomocí FT-IR, průtokové cytometrie a mikroskopie s fluorescenční sondou. Růstové křivky a průtoková cytometrie byly také použity pro studium působení organických látek na bakteriální buňky, kdy bylo zjištěno, že zatímco benzen *C. necator* H16 i *C. necator* PHB⁻⁴ neovlivňuje, p-nitrofenol působí jako inhibitor růstu na oba typy kultur. V neposlední řadě byl pomocí plynové chromatografie studován efekt p-nitrofenolu na tvorbu PHA.

ABSTRACT

This thesis deals with the effect of magnetic field and organic substances, namely benzene and p-nitrophenol, on cell of PHA producing bacteria *Cupriavidus necator* H16 and mutant strain *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, which does not produce polyhydroxyalkanoates. Static magnetic field was generated by both permanent magnet and electromagnet. The effect of magnetic field on the growth of bacterial cells was studied using growth curves. It was found that cultivation in magnetic field and mineral medium mostly inhibits bacterial growth. Also the amount of polyhydroxyalkanoates was observed using FT-IR, flow cytometry and microscopy with fluorescent dye. Growth curves and flow cytometry were also used to study the influence of organic substances on bacterial cells. It was found that while benzene does not affect either *C. necator* H16 or *C. necator* PHB⁻⁴, p-nitrophenol acts as the inhibitor of bacterial growth for both cultures. Finally the impact of p-nitrophenol on the accumulation of PHA was studied using gas chromatography.

KLÍČOVÁ SLOVA

Magnetické pole, benzen, p-nitrofenol, polyhydroxyalkanoáty, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

KEYWORDS

Magnetic field, benzene, p-nitrophenol, polyhydroxyalkanoates, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴.

MRÁZOVÁ, Kateřina. *Vliv magnetického pole a dalších vybraných stresorů na fyziologii mikrobiálních buněk*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113533>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a odborné vedení. Dále patří můj dík Ing. Evě Slaninové za její trpělivost, ochotu, podnětné připomínky a čas, který mi věnovala. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za jeho vstřícnost a pomoc při realizaci experimentů a Bc. Klaudii Kőbőlové za spolupráci v laboratoři a poskytnutí fotografie pro srovnání kultivace bakterií v různých objemech média.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1.	Mikroorganismy.....	8
2.1.1.	Prokaryota	8
2.1.2.	Eukaryota	8
2.1.3.	<i>Cupriavidus necator</i>	10
2.2.	Vybrané stresové faktory a stresová odpověď mikroorganismů.....	12
2.2.1.	Oxidativní stres	12
2.2.2.	UV záření	14
2.2.3.	Osmotický stres	14
2.2.4.	Teplotní stres	16
2.2.5.	Organické polutanty	18
2.2.6.	Magnetické pole a jeho druhy	20
2.3.	Současný stav řešené problematiky	22
2.3.1.	Inhibice růstu buněk magnetickým polem	22
2.3.2.	Vliv magnetického působení na buněčné membrány.....	23
2.3.3.	Stacionární magnetické pole a ROS.....	24
2.3.4.	Efekt magnetického pole na bakteriální biofilm	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Použité bakterie, chemikálie a přístroje	27
3.1.1	Použité bakterie	27
3.1.2	Použité chemikálie	27
3.1.3	Použité přístroje.....	27
3.2	Kultivace bakterií a analýzy.....	27
3.2.1	Příprava inokula	27
3.2.2	Stanovení růstových křivek v magnetickém poli	28
3.2.3	Stanovení IR spektra při kultivaci v magnetickém poli	30
3.2.4	Analýza na úrovni jedné buňky.....	30
3.2.5	Stanovení růstových křivek v magnetickém poli a osmotickém stresu	30
3.2.6	Stanovení růstových křivek v přítomnosti organických polutantů.....	31
3.2.7	Stanovení viability buněk pomocí průtokového cytometru	31
3.2.8	Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie.....	31
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	33
4.1	Vliv magnetického pole	33
4.1.1	Rozdíl vlivu permanentního magnetu a elektromagnetu.....	33
4.1.2	Vliv magnetického pole společně s osmotickým stresem.....	36
4.1.3	Stanovení PHA v bakteriálních buňkách vystavených magnetickému poli...	40
4.1.4	Charakterizace morfologie bakteriálních buněk	43

4.2	Vliv organických polutantů.....	45
4.2.1	Vliv organických polutantů na dělení buněk.....	45
4.2.2	Viabilita buněk stanovená pomocí průtokového cytometru.....	48
4.2.3	Vliv p-nitrofenolu na produkci PHA.....	49
5	ZÁVĚR.....	50
	LITERATURA.....	52
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	58

1 ÚVOD

Mikroorganismy, které se vyskytují ve volném prostředí, jsou často vystaveny podmínkám nevhodným pro jejich růst. Mezi ty nejběžnější patří osmotický stres, teplotní stres či působení UV záření. Aby dané nepříznivé podmínky přežily, využívají mikroorganismy různé způsoby stresové odpovědi. Zvýšení stresové odolnosti bakterií například pomáhá akumulace polyhydroxyalkanoátů v buňkách. Tyto polyestery hydroxykyselin jsou produkovány bakteriemi jako zásobní látky v prostředí nadbytku uhlíku a současné limitaci obsahu např. dusíku či síry v médiu. Granule PHA v bakteriálních buňkách mohou tvořit až 90 % hmotnosti sušiny. Tato práce se blíže zaměřuje na vliv stresového působení magnetického pole a aromatických látek na bakteriální buňky producentů PHA.

Magnetické pole je vytvářeno permanentními magnety případně elektromagnety a může být rozděleno do několika různých skupin, nejčastěji podle změny magnetické indukce na stacionární a nestacionární, případně podle velikosti magnetické indukce na slabé, mírné, vysoké a velmi vysoké. Na těchto vlastnostech závisí pak, jakým způsobem bude magnetické pole buňky ovlivňovat, převážně se hovoří o inhibičním efektu na růst bakteriálních buněk a narušování buněčných membrán.

Benzen a p-nitrofenol jsou organické látky, které jsou stále více spojovány se znečišťováním životního prostředí. Do půd, vod či ovzduší se dostávají například jako odpad výroby paliv, pesticidů, farmaceutik a dalších chemikálií. Kvůli jejich odolné aromatické struktuře je nelze snadno z prostředí odstranit a hrozí problém jejich bioakumulace, který je dále spojován až s karcinogenními účinky na organismy. Některé bakterie ale dokáží aromatické látky metabolizovat až na oxid uhličitý, případně jsou schopni producenti polyhydroxyalkanoátů metabolity aromátů začlenit do řetězců těchto polymerů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Mikroorganismy

Všechny mikroorganismy je možné rozdělit v rámci hierarchického systému do skupin podle jejich podobnosti. Nejvyšší taxonomická kategorie je doména, která je dále rozdělena v závislosti na genetické podobnosti do dvou skupin prokaryota a eukaryota. Archea a bakterie jsou společně řazeny mezi mikroorganismy s prokaryotickým typem buněk a do domény eukaryota patří, mikroorganismy s eukaryotickým typem buněk [1].

2.1.1. Prokaryota

Prokaryota jsou jednobuněčné mikroorganismy, mezi které se řadí bakterie a archea. Jejich buňky jsou tvořeny amorfní cytoplazmou obklopenou plazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Podle tvaru mohou být tyto mikroorganismy děleny například na kulovité koky, tyčinkovité bacily, zahnutá vibria, spirálové spirily či spirochéty. Buněčná stěna, která udržuje tvar buňky a chrání ji před osmotickým tlakem, je u bakterií tvořena peptidoglykany a pseudopeptidoglykany u archeí. Podle jejího složení jsou pak bakterie rozděleny na základě Gramova testu barvitelnosti stěny na grampozitivní a gramnegativní [1].

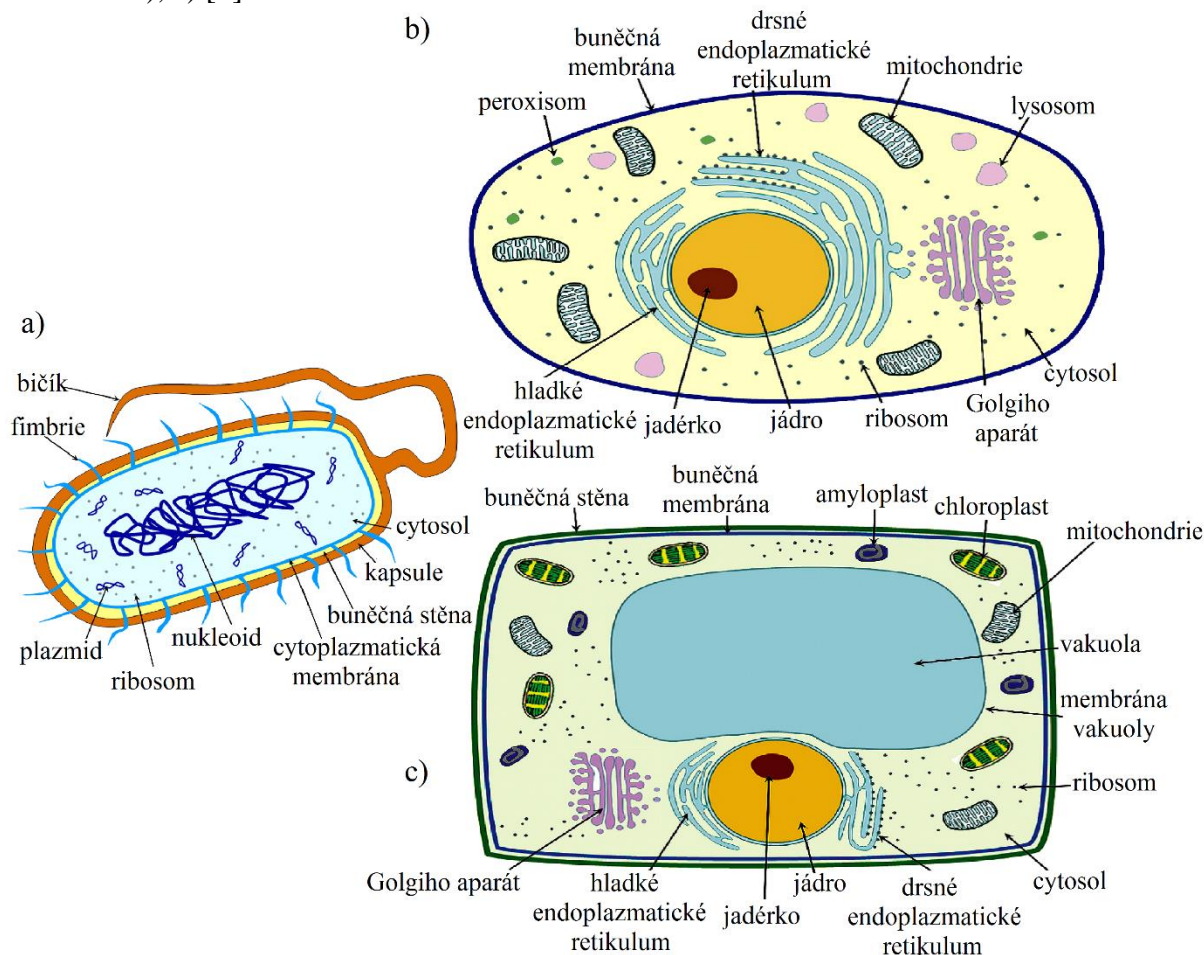
Intracelulární prostředí obklopené buněčnou membránou je tvořené především cytoplazmou buněk. Jedná se o viskózní látku s vysokou koncentrací proteinů, solí a metabolitů. Jelikož prokaryota nemají buněčné jádro ani jiné organely jako mitochondrie, Golgiho aparát nebo chloroplasty, viz obrázek 1a), probíhají veškeré metabolické procesy v multienzymových granulích, v buněčné membráně nebo například periplasmě. Další útvary v cytoplasmě vznikají tzv. invaginací buněčné membrány a plní v prokaryotických buňkách specifické funkce. Jsou to například karboxysomy, chlorosomy nebo magnetosomy, případně granule obsahující zásobní látky jako polyhydroxyalkanoáty či glykogen [2]. Konkrétně magnetosomy jsou tvořeny krystaly magnetitu (Fe_3O_4) či greigitu (Fe_3S_4) o velikosti přibližně 50 nm. Tyto inkluze se nachází u magnetotaktických bakterií, jako je například *Magnetospirillum magneticum*, a umožňují orientaci pohybu bakterií s ohledem na magnetické póly Země. Tento pohyb je nazýván magnetotaxe. Jednotlivé magnetosomy jsou v buňce organizovány do řetězců a pasivně orientují bakterii v magnetickém poli tak, aby dosáhla preferovaných redoxních podmínek [3].

2.1.2. Eukaryota

Zatímco prokaryotické mikroorganismy jsou pouze jednobuněčné, eukaryota zahrnují jak jednobuněčné organismy, jako améby nebo kvasinky, tak mnohobuněčné organismy. V porovnání s prokaryotickými buňkami jsou eukaryotické buňky mnohonásobně větší. Například buňka *Escherichia coli* má na délku rozměr 2 μm a savčí buňky jsou 10–30 μm dlouhé. Eukaryotické buňky jsou také komplexněji organizované. Obsahují organely, což jsou útvary se specifickými funkcemi [4]. Genetická informace je uložena ve formě chromozomů složených z DNA a proteinů v jádru buňky, které je obaleno dvěma membránami. Nicméně část chromozomů nesoucí geny pro rRNA je uložena v jadérku. Na vnější membránu jádra navazuje dále drsné endoplazmatické retikulum s ribosomy, jehož úkolem je syntéza proteinů. Hladké endoplazmatické retikulum pak neobsahuje navázané ribosomy a účastní se metabolismu lipidů a sacharidů. Další z organel jsou mitochondrie skládající se ze dvou membrán, ve kterých probíhá syntéza ATP a zároveň buněčné dýchání, které probíhá na vnitřní membráně [5].

Mitochondrie společně s chloroplasty obsahují vlastní DNA [5]. Endosymbiotická teorie předpokládá, že tyto organely mají původ ve volně žijících bakteriích a následně jejich symbiotickému sloučení s prvními eukaryoty. Podle ní se po vývinu fotosyntézy a vytvoření cyanobakterií začal v atmosféře objevovat obsah kyslíku. V důsledku výskytu Fe^{2+} v oceánech byl tento kyslík spotřebováván na jeho oxidaci za vzniku Fe^{3+} . Při postupném vyčerpávání Fe^{2+} se v atmosféře začalo množství kyslíku zvyšovat, což umožnilo vznik aerobních organismů. Pro anaerobní organismy byla ale přítomnost kyslíku toxická a možností jak přežít, bylo pohltnout respirující bakterie. Tyto symbiotické bakterie pak hostitelské buňce pomohly odbourávat kyslík a volné radikály. Po stabilizaci složení atmosféry došlo i ke stabilizaci symbiózy těchto organismů, kdy z pohlčené bakterie vznikla mitochondrie a hostitelská buňka vytvořila membránu kolem svého genetického materiálu. Mitochondrie tak mohly vzniknout ještě před tím, než se vyvinulo jádro, cytoskelet a další organely [6].

Rozdíl není pouze mezi prokaryotickým a eukaryotickým typem buňky, ale je i v samotné doméně eukaryota, kde jsou dále rozlišovány buňky na rostlinné či živočišné, jelikož rostlinné buňky jsou obklopeny kromě cytoplazmatické membrány také buněčnou stěnou, viz obrázek 1b), c) [5].



Obrázek 1: Schéma buňky a) prokaryotické, b) eukaryotické živočišné, c) eukaryotické rostlinné [5]

2.1.3. *Cupriavidus necator*

Jako vybraný zástupce byl zvolen *Cupriavidus necator* H16 z důvodu jeho dlouhodobého výzkumu v rámci vlivu různých stresových faktorů. *Cupriavidus necator* H16 je gramnegativní bakterie vyskytující se jak v půdě, tak ve sladkovodních prostředích. Tento mikroorganismus, dříve nazývaný *Ralstonia eutropha* H16, *Wautersia eutropha* či *Alcaligenes eutrophus*, slouží jako modelový bakteriální kmen pro studium biotechnologické produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) [7]. *C. necator* patří mezi nepatogenní mikroorganismy. Výhodou použití této bakterie při studiu polyhydroxyalkanoátů je to, že na rozdíl od jiných producentů (např. *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Azobacter vinelandii*) nevytváří společně s PHA také látky jako alginát či rhamnolipidy při kultivaci za nadbytečného množství zdroje uhlíku [8].

Začátkem 60. let byly zkoumány mutantní kmeny bakterie *C. necator* a podařilo se izolovat bakteriální kmeny, které neměly schopnost syntetizovat polyhydroxyalkanoáty. U většiny těchto mutantních kmenů docházelo pouze ke snížení produkce, ale *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ nevytvářel žádný polyhydroxybutyrát, i když rychlost růstu byla podobná kmenu *C. necator* H16. Proto je tato bakterie často využívána pro charakterizaci genů kódujících PHA syntázy jiných bakterií [9].

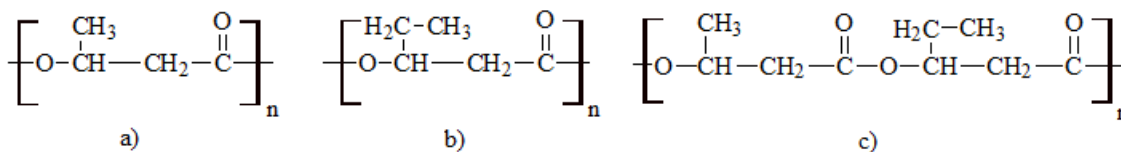
2.1.3.1. Polyhydroxyalkanoáty

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, polyhydroxyalkanoáty jsou polyestery R-hydroxykyselin, které jsou produkovány jak grampozitivními tak gramnegativními bakteriemi a plní funkci zásobních látek. PHA patří mezi skupinu biopolymerů, které by se mohly stát alternativou pro plasty vytvořené z ropných zdrojů. Konvenční plasty se rozkládají velmi pomalu a jejich spalování je spojeno s tvorbou toxických látek, zatímco biopolymery jako PHA jsou 100 % biodegradabilní a některé také biokompatibilní. To umožňuje jejich případné medicínské využití [10].

Podle délky řetězce je možno rozdělit polyhydroxyalkanoáty na scl („*short-chain-length*“) PHA, obsahující ve své struktuře monomery o délce 3–5 uhlíků, nebo mcl („*medium-chain-length*“) PHA, skládající se z monomerů o délce 6–14 uhlíků [10]. V závislosti na jejich složení mají polyhydroxyalkanoáty odlišné vlastnosti. Mezi ty společné se ale řadí to, že jsou termoplastické, ve vodě nerozpustné, rezistentní vůči UV záření, ale málo odolné vůči kyselinám a zásadám. Dále jsou například PHA rozpustné ve chloroformu či dalších chlorovaných uhlovodících a nejsou toxické [11].

Jedním z nejlépe popsáných zástupců těchto látek je polyhydroxybutyrát, tvořený buď monomerem 3-hydroxybutyrátu (P(3HB)) nebo 4-hydroxybutyrátu (P(4HB)). P(3HB) je díky své stereoregularitě vysoce krystalický, málo prostupný pro kyslík a má dobré termoplastické vlastnosti. V porovnání s konvenčními plasty typu polypropylenu má ale P(3HB) horší mechanické vlastnosti, například Youngův modul. Jedná se o křehký a tvrdý materiál s molekulovou hmotností 10–3000 kDa v závislosti na producentovi (např. *Cupriavidus necator*), zatímco P(4HB) je elastická látka s pevností podobnou polyethyleny. Jeho vlastnosti se mohou lišit, pokud se vyskytuje v kombinaci s jinými hydroxykyselinami, jelikož polyhydroxyalkanoáty mohou být také tvořeny kopolymery například P(3HB-co-3HV), obsahující ve své struktuře monomery 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Tato látka má nižší krystalinitu, bod varu nebo tuhost a je více elastická než homopolymer skládající se čistě

z P(3HB). Konkrétní vlastnosti daného polymeru závisí na poměru jednotlivých monomerů [10]. Struktury výše zmíněných polyhydroxyalkanoátů znázorňuje obrázek 2.



Obrázek 2: Polyhydroxyalkanoáty a) P(3HB), b) P(3HV), c) P(3HB-co-3HV)

Produkce polyhydroxyalkanoátů probíhá za nadbytku zdroje uhlíku a současného nedostatku prvku jako dusík, kyslík, fosfor nebo síra. V buňkách mohou tyto látky pak tvořit až 90 % hmotnosti sušiny. Klíčovým pro tvorbu PHA je enzym PHA syntáza (PhaC), která se dále dělí do 4 skupin v závislosti na jejich struktuře a substrátové specifitě. Třída I vytváří polyhydroxyalkanoáty s monomery o velikosti 3–5 uhlíků, třída II monomery s velikostí 6–14 uhlíků, třída III stejně jako třída IV je na rozdíl od předchozích tvořena 2 podjednotkami a obě využívají krátké monomery s velikostí 3–5 uhlíků [9].

Jednou z výhod produkce polyhydroxyalkanoátů, jako náhrady za klasické plasty, je možnost kultivace mikroorganismů na odpadních surovinách. Bylo například zjištěno, že bakterie jsou schopny akumulovat PHA, pokud je jako zdroj uhlíku použit glycerol, celulóza, kukuřičný škrob nebo také různé druhy olejů včetně olivového, palmového nebo odpadního fritovacího [10]. Problémy využití PHA spočívají například v teplotě tání PHB, která je velmi blízká teplotě rozkladu, nebo také v jeho vysoké krystalinitě jako příčině špatných mechanických vlastností. Teplotní nestabilita znemožňuje úpravu plastu klasickými procesními technikami. Přičemž u mcl PHA bylo zjištěno, že při určité délce postranního řetězce mají tyto látky elastomerní vlastnosti, ale pouze v úzkém rozmezí teplot kvůli nízké teplotě tání. Při práci v blízkosti této teploty se polymer stává amorfním a lepivým. Také se zvětšující se délkou postranního řetězce se tento plast stává více viskózním [12].

Hlavní nevýhodou využití je vysoká výrobní cena, která může být až patnáctkrát vyšší než u konvenčních plastů, například polypropylenu. Tato částka závisí převážně na použitém zdroji uhlíku pro kultivaci a následně pak na způsobu získávání PHA z mikrobiálních buněk. Jednou z nejčastějších metod bývá extrakce rozpouštědly jako chloroform nebo aceton, kdy ale nastává problém s následnou likvidací odpadu těchto organických látek. Alternativou je pak extrakce PHA z buněk pomocí enzymů, které jsou ale dražší než organická rozpouštědla. V současnosti se jeví slibně metoda využívající extrakce na bázi esterů kyseliny mléčné, případně využití roztoků s mírně zásaditým pH [13].

2.1.3.2. Metabolismus PHA a jeho regulace

Syntéza PHB probíhá ve třech enzymově regulovaných krocích. Dvě molekuly acetyl-CoA kondenzují za vzniku acetoacetyl-CoA při katalýze 3-ketothiolázou. Následně probíhá redukce acetoacetyl-CoA reduktázou na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA a posledním krokem je uvolnění CoA za tvorby PHB pomocí PHB syntázy. Hlavní v regulaci tohoto metabolismu je intracelulární koncentrace acetyl CoA a volného CoA. Zvýšení produkce PHB je podporováno při vysokých koncentracích NAD(P)H a vysokém poměru NAD(P)H/NAD(P). Díky inhibici enzymu citrát syntázy vyšší koncentrací NADPH je podporován metabolisme

acetyl-CoA syntézou PHB. Regulací dostupnosti CoA je pak kontrolována i aktivita 3-ketothiolázy [14].

Syntéza i degradace PHA jsou regulovány také na úrovni genové transkripce. Pro různé bakterie bylo popsáno více než 20 druhů operonů zapojených do syntézy PHA. Geny kódující výše zmíněné enzymy, které jsou potřebné pro syntézu PHA, jsou označeny v abecedním pořadí a to konkrétně *phaA* pro ketothiolázu, *phaB* pro acetoacetyl-CoA reduktázu a *phaC* pro PHB syntázu. Geny pro enzymy zapojené v degradaci PHA jsou pak značeny v obráceném abecedním pořadí, kdy *phaZ* kóduje PHA depolymerázu [15].

Konkrétně pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa* byly popsány dva geny pro PHA syntázu *phaC1* a *phaC2*, které jsou odděleny genem pro PHA depolymerázu. Společně s nimi byl dále popsán gen *phaD*, který kóduje transkripční regulátor, *phaF* a *phaI*. *PhaF* popsán u bakterie *Pseudomonas oleovorans* je spojený s negativní regulací genů pro syntézu PHA. Pokud byla bakterie kultivovaná v podmínkách vhodných pro akumulaci PHA, byl protein PhaF vázán na granule PHA. Díky tomu bylo menší množství PhaF dostupné pro represí genů a tím byla zvýšena transkripce *phaC1* [16].

2.2. Vybrané stresové faktory a stresová odpověď mikroorganismů

Mikroorganismy vyskytující se v přirozeném prostředí jsou většinou vystaveny různým stresovým působením. Tedy podmínkám, které nejsou optimální pro jejich růst a organismy se jim musí přizpůsobit. V následující kapitole jsou uvedeny konkrétní příklady stresových vlivů a následných způsobů, kterými na ně mikroorganismy reagují.

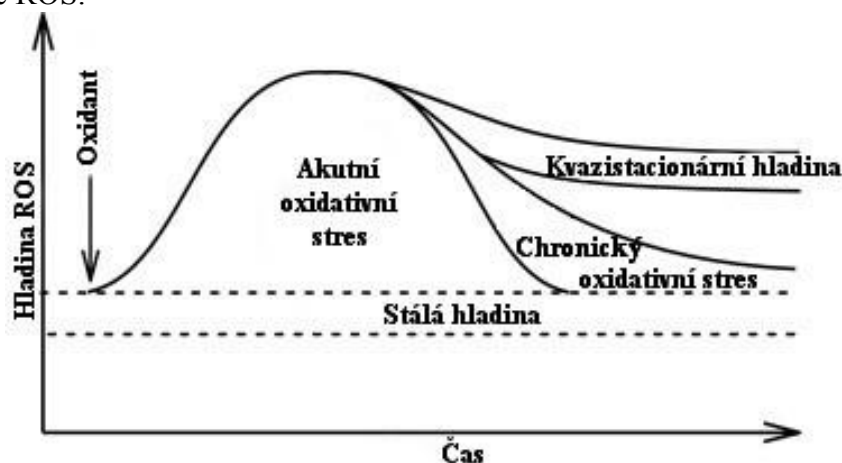
2.2.1. Oxidativní stres

Oxidativní stres je definován jako situace, kdy dojde ke zvýšení stálé koncentrace reaktivních forem kyslíku ROS („*reactive oxygen species*“) [17]. ROS tvoří skupinu volných radikálů a molekul odvozených od molekulárního kyslíku. K jejich vzniku dochází například v rámci buněčného dýchání, enzymaticky fagocytujícími buňkami nebo pokud jsou buňky vystaveny ionizujícímu záření [18]. Změna jejich koncentrace může být náhlá, nebo probíhat po delší dobu. Také nemusí spočívat nutně pouze ve zvýšení koncentrace ROS v důsledku vyššího množství intracelulárních či extracelulárních látek, jejichž oxidací vznikají ROS. Může být také způsobena vyčerpáním zásob nízkomolekulárních antioxidantů, inaktivací či snížením produkce antioxidantních enzymů případně kombinací výše zmíněných [17]. Pokud buňky nedokáží odbourávat volné radikály, dochází ke zvýšené tvorbě ROS, které následně ničí nejen jednotlivé buňky ale i tkáň a orgány. Toto poškození způsobuje reakce velkého množství makromolekul od DNA přes proteiny i lipidy s ROS a má za následek zvýšenou rychlost mutagenese až buněčnou smrt [18].

Volné radikály jsou reaktivní chemické intermediáty, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Tyto radikály při kontaktu s jinými látkami okamžitě reagují, odebírají jim elektron a tím je oxidují. Daná látka se poté stává sama volným radikálem a spouští se tak řetězec reakcí, který vede k oxidaci biomolekul jako lipidů, aminokyselin nebo mutaci DNA a tím k poškození buněk [18]. Vznik ROS ale není spojený pouze s tvorbou volných radikálů. Za anaerobních podmínek je až 90 % kyslíku redukováno na vodu pomocí elektrontransportního řetězce a nedochází tak ke vzniku ROS. Zbývajících 10 % kyslíku ale bývá převáděno na superoxidový anion radikál ($O_2^{\cdot-}$), který je následně redukován na peroxid vodíku (H_2O_2). Tato látka nepatří mezi volné radikály, ale je více reaktivní než

molekulární kyslík. Pokud přijme molekula peroxidu další elektron, disociuje za tvorby hydroxylového radikálu (HO^\bullet) a hydroxylového aniontu (OH^-), kdy hydroxylový anion po reakci s protonem a hydroxylový radikál s protonem a elektronem vytváří molekulu vody [17].

Oxidativní stres může být dále rozdělen do několika skupin. Koncentrace ROS se za normálních podmínek pohybuje ve stálém rozmezí hodnot. Pokud se ale organismus dostane do náhlého kontaktu s určitými oxidanty, dochází k tomu, že se hladina ROS prudce zvýší. Je-li buňka schopna dostatečně reagovat na tuto změnu, vrací se koncentrace ROS na stálou hladinu. Jakmile dojde ke zvýšení koncentrace ROS oproti standardním podmínkám po určitou dobu, dochází k fyziologickým změnám v buňce, například ke zvýšení exprese určitých genů, je tato situace pak nazývána „akutní oxidativní stres“. V některých případech ale buňka není schopna zvýšit dostatečně produkci antioxidantů a dalších souvisejících enzymů a koncentrace ROS zůstává stále zvýšená. Pak je tento stav nazýván jako „chronický oxidativní stres“. V poslední z možných situací dojde opět ke zvýšení koncentrace ROS. Ta se ale stabilizuje na dané vyšší hladině, takzvané kvazistacionární, v důsledku například fyziologických změn organismu a je nutné, aby došlo ke změnám v celé homeostáze [17]. Obrázek 3 uvádí schématické znázornění jednotlivých typů oxidativního stresu v závislosti na čase a hladině ROS.



Obrázek 3: Typy oxidativního stresu podle času a hladiny ROS [17]

S ohledem na neustálou přítomnost ROS si mikroorganismy vybudovali několik mechanismů pro regulaci koncentrací ROS. Jedním z nich je změna propustnosti membrány pro tyto látky. Zatím co $\text{O}_2^{\bullet -}$ prochází membránou přes aniontové kanály, H_2O_2 se pravděpodobně dostává do buněk pomocí akvaporinů, kanálů přes které prochází do buňky voda. Bylo zjištěno, že buňky kvasinek mění složení buněčné membrány, pokud jsou vystaveny oxidativnímu stresu. A to tak, že dochází ke snížení poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin v lipidech tvořících membrány, snížení obsahu kyseliny olejové, zvýšení poměru fosfatidylcholinu a fosfatidylethanolaminu nebo zvýšení koncentrace skvalenu (prekurzoru sterolu), zatímco množství sterolu zůstává stejné [19].

2.2.2. UV záření

Další vliv, kterému se mikroorganismy ve volné přírodě nevyhnou je UV záření, které obsahuje 3 základní složky: UVA s vlnovou délkou 315–400 nm, UVB s vlnovou délkou 280–315 nm a UVC s vlnovou délkou <280 nm. Na Zemi dopadá UV záření (3–5 %) společně s viditelným (42–43 %) a infračerveným zářením (52–55 %), díky čemuž UV záření ovlivňuje biologické systémy. Příkladem mohou být změny ve struktuře proteinů, nukleových kyselin nebo inhibice buněčného růstu. Společně s volnými radikály či ionizujícím zářením může být UV záření příčinou špatného zařazení bází v průběhu replikace, hydrolytického štěpení způsobujícího například deaminaci bází, či oxidativního poškození způsobeného jak přímo ionizačním zářením, tak reakcí DNA s volnými radikály vznikajícími v důsledku UV radiace. Vystavení UV či ionizujícímu záření může vyústit až ve štěpení obou řetězců nukleové kyseliny [20].

Zatímco UVA záření není absorbováno nativní DNA a nemá tak vysoký podíl na jejím poškození, UVB již způsobuje chemické modifikace DNA a změny její molekulární struktury [20]. Největší vliv vůči mikroorganismům má UVC záření o vlnové délce 250–270 nm označováno jako germicidní spektrum, jelikož je nejvíce absorbované mikrobiální DNA a tudíž má fatální důsledky pro samotný mikroorganismus. Nejsilnější účinky má UVC záření při 262 nm. Působení UVC na nukleové kyseliny má za následek například dimerizaci pyrimidinových molekul. U thyminu tak dochází ke vzniku cyklobutanových dimerů a replikace DNA obsahující tyto dimery je velmi obtížná. Pokud se i přesto DNA replikuje, vznikají defekty a mikrobiální buňky obsahující takto poškozenou DNA nejsou viabilní [21].

Své využití nachází UV záření jako alternativa chemických desinfekcí například pro úpravu vody. Jeho výhodou oproti chemikáliím je to, že nevznikají vedlejší produkty ani bakterie rezistentní vůči dané látce. Baktericidní účinky UV záření závisí nejen na použité vlnové délce, ale i na času expozice a konkrétním mikroorganismu [22]. Pro bakterie rezistentní vůči antibiotikům bylo například zjištěno, že při použití UVC lampy s intenzitou záření 15,54 mW/cm² ve vzdálenosti 25,4 mm od vzorku dochází k 100% inhibici růstu pro *Staphylococcus aureus* při vystavení záření po dobu 90 s, ale pro *Enterococcus faecalis* je nutná doba pouze 45 s. Pro fungi jako *Candida albicans* byla zjištěna inhibice růstu o 99,9 % po působení UVC záření 15–30 s při stejném uspořádání experimentu. Tato účinnost byla u dříve zmiňovaných bakterií dosažena již po 5 s [21].

2.2.3. Osmotický stres

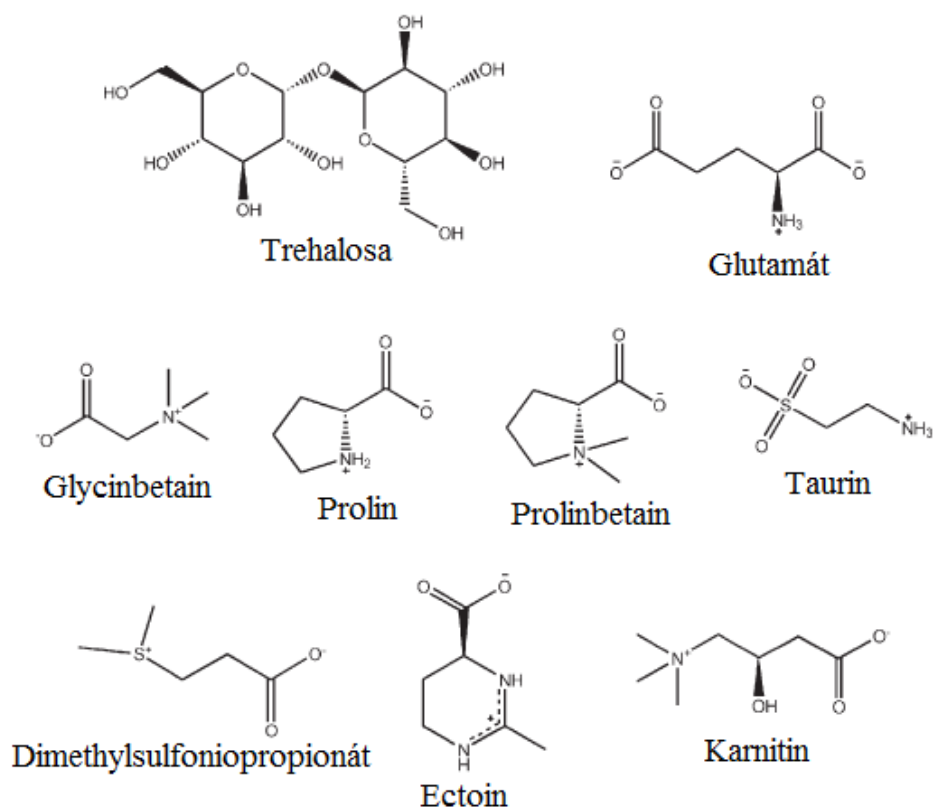
Mezi další stres, kterému jsou mikroorganismy neustále vystaveny, patří osmotický stres, který je nutno regulovat pro uchování homeostázy. Cytoplazmatické membrány buněk jsou nepropustné pro makromolekuly, zatímco voda prochází fosfolipidovou dvouvrstvou selektivními kanály nazývanými akvaporiny. I v izotonickém prostředí hrozí, že buňka bude přijímat velké množství vody a dojde k jejímu otoku. Proto je v plazmatické membráně regulována koncentrace iontů. Jakmile se buňka nachází v prostředí osmotického gradientu, dochází k přesunu molekul vody z buňky či do buňky, což má vliv na změnu jejího tvaru nebo i funkcí. Osmotický stres je pak označení podmínek, kdy se buňka nachází v prostředí s vyšší či nižší koncentrací iontů než jaká je za izotonických podmínek [23].

Když dojde k vytvoření rozdílu mezi intracelulární a extracelulární osmolalitou, mění se objem buněk tak, aby byl vyrovnán osmotický tlak. Při nižší extracelulární osmolalitě (hypotonické prostředí) přijímá buňka vodu ze svého okolí, což vede k jejímu otoku. Pokud je ale buňka v prostředí s vyšší extracelulární koncentrací iontů (hypertonické prostředí) přechází molekuly vody z buňky do vnějšího prostředí a objem buňky se zmenšuje. Odchyly od objemu buněk v normálním prostředí mají pak za následek například změnu koncentrace makromolekul v buňce, zvýšení iontové síly v buňce, a tím snížení aktivity některých proteinů, změny ve struktuře chromatinu nebo narušení plazmatické membrány a případnou apoptózu buňky [23].

Bakteriální odpověď na osmotický stres probíhá ve dvou úrovních. Okamžitá reakce v řádu sekund až minut je zprostředkovávána pomocí enzymů a transportních systémů tak, že dochází ke snižování/zvyšování aktivity proteinů. Dlouhodobě pak na osmotický stres reaguje buňka až na úrovni transkripce a translace syntézou nových enzymů, nebo složek buněčné membrány za účelem obnovit fyziologický rovnovážný stav [24].

Buňky rovněž reagují na změnu osmotického tlaku akumulací nebo uvolňováním osmolytů, což jsou ve vodě rozpustné organické látky obsahující anorganické ionty, především K^+ , a mohou se v buňkách vyskytovat ve vysokých koncentracích. Obrázek 4 uvádí některé z těchto sloučenin produkované bakterií *E. coli* pokud se nachází v hypertonickém prostředí [25]. Enzymy, které jsou zodpovědné za produkci osmolytů, jsou často regulovány na úrovni transkripce. Například enzym cyanobakterií GgpS (glukosylglycerolfosfát syntáza), který reguluje tvorbu glukosylglycerolu, je vázán na molekulu DNA v inaktivní formě. Jestliže se bakterie vyskytuje v hypertonickém prostředí, tedy prostředí s vysokou koncentrací Na^+ , roste koncentrace těchto iontů i v cytoplazmě. To má za následek přerušení vazby GgpS na DNA a enzym je aktivován. Syntetizované molekuly glukosylglycerolu vytlačují ionty Na^+ z cytoplazmy a ty jsou aktivně přenášeny z buňky. Snížením koncentrace Na^+ v cytoplazmě je pak enzym opět inaktivován a vázán na DNA [24].

Hypotonické prostředí způsobuje také změny ve složení membránových lipidů. V prostředí s vysokou koncentrací solí dochází k narušování lipidické dvojvrstvy a bakterie proto vytváří více anionických fosfolipidů, případně glykolipidů. U bakterií jako *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas halosaccharolytica* byla sledována zvýšená koncentrace difosfatidylglycerolu (DPG) či fosfatidylglycerolu (PG) ve srovnání s neutrálním fosfatidylethanolaminem (PE). *Bacillus subtilis*, kultivovaný v hypertonickém médiu vykazoval pak snížení koncentrace PG z 40 % na 31 % zatímco obsah kardiolipinu (CL) vzrostl z 24 % na 31 %. Kromě polární části fosfolipidů mohou podléhat změnám také mastné kyseliny, kdy reakcí na osmotický stres může docházet například ke zvýšení podílu nenasycených kyselin, změně izomerie na dvojně vazbě nebo výskytu kratších řetězců mastných kyselin [26].

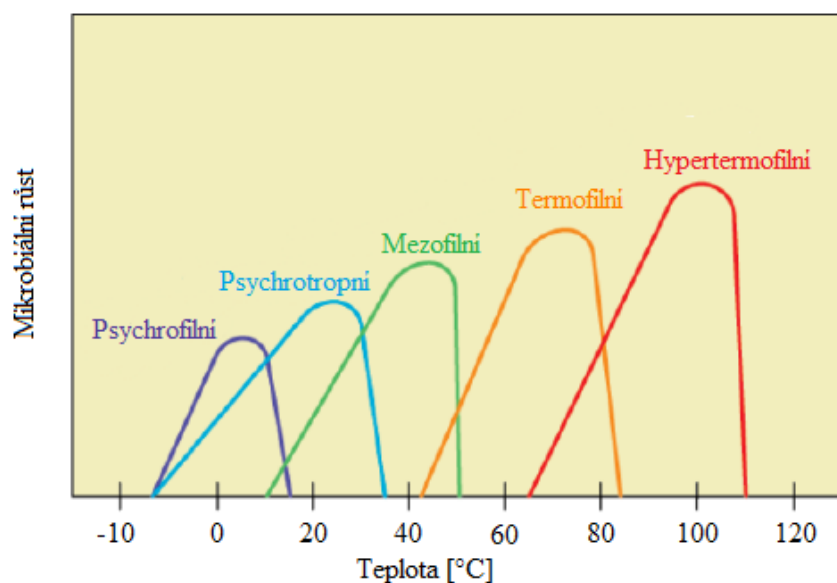


Obrázek 4: Osmolyty produkované bakterií *E. coli* [25]

2.2.4. Teplotní stres

Podle optimální teploty, ve které se bakterie přirozeně vyskytují, mohou být rozděleny do tří základních skupin. Termofilní bakterie rostou při teplotách vyšších než 50 °C, mezofilní při pokojové teplotě a psychofilní přežívají teploty i nižší než 0 °C. Grafické znázornění optimálních teplot kultivace jednotlivých skupin znázorňuje obrázek 5 [27].

Termofilní mikroorganismy se musí potýkat s problémem udržet ve stabilní formě složky buňky jako buněčnou membránu a její propustnost, nukleové kyseliny nebo proteiny. Cytoplazmatická membrána se u prokaryotických organismů účastní tvorby energie tím, že přeměňuje elektrochemický gradient přes membránu na molekuly ATP. Tento gradient vzniká přenášením protonů z buňky a umožňuje správnou funkci membránové ATP syntázy. Vysoká teplota ale může narušovat selektivní permeabilitu membrány a tím měnit elektrochemický gradient. Odolnost membrány při nárůstu teploty je závislá na jejím složení, které se liší u bakterií i archeí. Bakteriální membrány jsou tvořeny dvouvrstvou fosfolipidů s esterovou vazbou na molekule glycerolu, zatímco u archeí je glycerol k nepolární části lipidů vázán dietherovou vazbou, která je odolnější vůči hydrolýze. Dále jsou řetězce lipidů v membránách archeí nasycené, takže jsou odolnější vůči oxidaci. Bakterie, které jsou vystaveny vysoké teplotě, tak mění složení membrány, aby byla zvýšena délka řetězce mastných kyselin, zvýšeno nasycení vazeb nebo sníženo větvení řetězce. Pro psychofilní organismy je pak především důležité dosáhnout dostatečné rychlosti reakcí i za nízké teploty. U enzymů izolovaných z těchto mikroorganismů bylo například zjištěno, že jsou více termosenzitivní nebo mají vyšší specifickou aktivitu v porovnání s mezofilními mikroorganismy [28].



Obrázek 5: Rozdělení mikroorganismů na základě ideální teploty pro jejich růst [27]

Pokud jsou bakterie vystaveny náhlému růstu teploty prostředí, dochází k indukci genů kódujících specifické proteiny, které pomáhají buňkám přežít ve stresových podmínkách. Při zvýšení teploty dochází k denaturaci proteinů a tvorbě jejich agregátů, které mohou způsobovat buněčnou smrt. Buňka se proto snaží tyto agregáty odstranit a zvýšit tvorbu HSPs („*heat shock proteins*“). Tyto makromolekuly fungují jako regulátory teplotního šoku, vystupují jako termosenzory, a to tak, že při fyziologické teplotě se vyskytují v inaktivní formě například vázány na protein, ale při zvýšení teploty dojde ke změně v 3D struktuře a přerušení vazby. Mezi tyto regulátory patří proteiny, RNA a DNA. Nukleové kyseliny mohou zaujímat 2 typy sekundárních struktur v závislosti na teplotě, a tím dochází ke změnám v transkripci či translaci ze základní úrovně na vysokou. Proteiny pak slouží jako represory transkripce při fyziologických podmínkách a při vysoké teplotě se odpojují od daných operátorů [29].

Dalším způsobem stresové odpovědi bakterií na teplotní šok je zapojení σ faktorů. Změna genové exprese je u bakteriálních buněk často kontrolována na úrovni transkripce změnami spojení katalytického jádra RNA polymerázy, enzymu, který rozpoznává potřebné geny za specifických podmínek a tvoří mRNA transkripty, a σ faktorů. Σ faktory jsou disociovatelné podjednotky prokaryotické RNA polymerázy, které po navázání na tento enzym společně vytváří holoenzym. Ten dále nasedá na promotor DNA a začíná transkripce. Σ faktor se ale krátce na to odpojuje a je uvolněn pro další vazbu s RNA polymerázou [30].

Sigma faktory je možno rozdělit do 2 základních kategorií na základě jejich podobnosti se sigma faktory, které byly popsány pro bakterii *Escherichia coli*. Skupina faktorů σ^{54} je odpovědná za regulaci transkripce v závislosti na změnách prostředí, ve kterém se bakterie nachází, a pro svou funkci vyžaduje aktivátor společně s hydrolýzou ATP. Druhou kategorií pak tvoří faktory σ^{70} . Ty patří mezi základní faktory zodpovědné za průběh transkripce v průběhu bakteriálního růstu a dále se dělí na 4 podskupiny [31]. Do skupiny I se řadí ty faktory, které řídí transkripci genů pro buněčný růst a metabolismus. V ostatních skupinách, nazvaných také jako alternativní sigma faktory, se nacházejí ty, které jsou zodpovědné za regulaci stresové odpovědi a jiných specifických fyziologických procesů. Skupina II (σ^S)

například aktivuje genovou expresi pro tvorbu proteinů, které jsou nutné pro udržení viability buňky po přechodu z exponenciální do stacionární fáze růstu. Skupina III (σ^B) řídí stresovou odpověď, pokud je bakterie vystavená například nadměrnému teplu, kyselému pH, vysokým koncentracím solí nebo nedostatku živin či oxidativnímu stresu. Poslední skupina IV (σ^E) pak odpovídá za detekci stresových podmínek v buněčné membráně, periplasmě nebo ve vnějším prostředí [30]. Pro bakterie *E. coli* byly popsány 2 typy sigma faktorů reagujících na výskyt proteinů denaturovaných vysokou teplotou. A to σ^{32} aktivován proteiny v cytoplazmě při teplotách 30–42 °C, a σ^E aktivovaný proteiny v periplasmě při teplotách 30–46 °C. Regulace σ^{32} probíhá 3 různými mechanismy. mRNA kódující σ^{32} vytváří sekundární strukturu při 30 °C, která umožňuje pouze základní úroveň translace. Se zvýšením teploty na 42 °C dochází k oddělení řetězců RNA, a tím ke zvýšení translace. Při 30 °C jsou dále σ^{32} vázány inaktivní na chaperonové systémy a disociují při zvýšené teplotě, čímž dochází k aktivaci daných sigma faktorů. Posledním mechanismem regulace σ^{32} je kontrola stability tohoto sigma faktoru pomocí proteáz. Σ^E je pak regulována pomocí operonu *rpoE-rseA-rseB-rseC*. RseA působí jako antisigma faktor a je částečně začleněn do vnitřní membrány. Na jeho C-terminální část řetězce v periplasmě je vázán RseB a N-terminální část řetězce pak v cytoplazmě váže σ^E . Pokud se zvýší teplota, aktivují se proteázy, které odštěpí část RseA společně s σ^E do cytoplazmy, kde se σ^E oddělí kompletně [29].

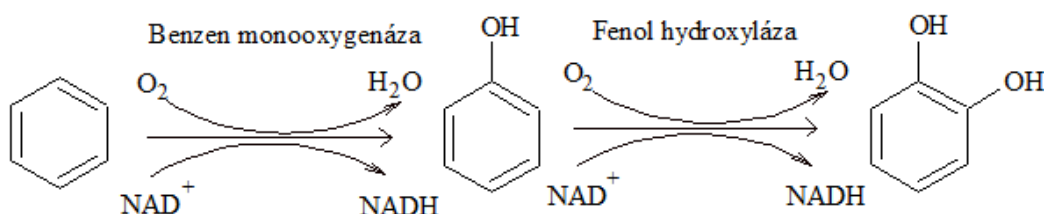
Snížením teploty na nižší hodnotu než je fyziologické optimum daného mikroorganismu, dochází také ke změnám ve fyziologii buněk. S nízkou teplotou jsou spojeny změny například v buněčné membráně, kdy se snižuje její fluidita a zvyšuje permeabilita, nebo snížení efektivity transkripce a translace nukleových kyselin [32]. Bakterie mohou upravovat fluiditu membrány několika následujícími způsoby: změnou velikosti a náboje polárních částí molekuly, změnou poměru délky řetězců mastných kyselin, změnou nasycenosti vazeb mastných kyselin nebo změnou poměru cis a trans izomerů mastných kyselin. Ne všechny tyto možnosti jsou ale dostatečně efektivní a mohou být použity jen v některých buněčných fázích. Například změny v délkách řetězců mastných kyselin jsou možné pouze u buněk v exponenciální fázi. Zato změna v nasycenosti vazeb nebo izomerii je jednou z nejpoužívanějších přístupů [33]. Zvýšením počtu nenasycených vazeb v řetězcích mastných kyselin dochází ke zvýšení fluidity membrány. Tato změna nasycenosti vazeb probíhá pomocí desaturáz, které jsou umístěny přímo v buněčné membráně, díky čemuž je reakce na teplotní stres tak rychlá. Například pro *Clostridium botulinum* bylo zjištěno zvýšení množství nenasycených vazeb z 27 % při 37 °C na 40 % při 8 °C [26]. Pro izomerii na dvojné vazbě pak platí, že zvýšený počet cis izomerů zvyšuje fluiditu membrány, zatímco trans izomerie fluiditu snižuje. To bylo pozorováno u psychofilní bakterie *Pseudomonas syringae* kultivované při 28 °C a 5 °C, kdy se počet trans izomerů zvyšoval s rostoucí teplotou [33].

2.2.5. Organické polutanty

V rámci otázky ochrany životního prostředí se momentálně čím dál více řeší znečištění vod, půdy i vzduchu a s tím spojená zdravotní rizika. Velkým problémem jsou zejména aromatické látky, které jsou díky své struktuře odolné vůči bioremediaci či jiným způsobům rozkladu [34]. Podle původu mohou být aromáty rozděleny na biologické a nebiologické. Prvně zmiňované jsou vytvářeny rostlinami, případně mikroorganismy, zatímco zdrojem nebiologických mohou být například odpady z výroby paliv, chemikálií, plastů, výbušnin nebo

farmaceutik. Takové látky jsou pak nazývány xenobiotika a jsou nebezpečná z důvodů bioakumulace, toxicity, případně karcinogenity [35].

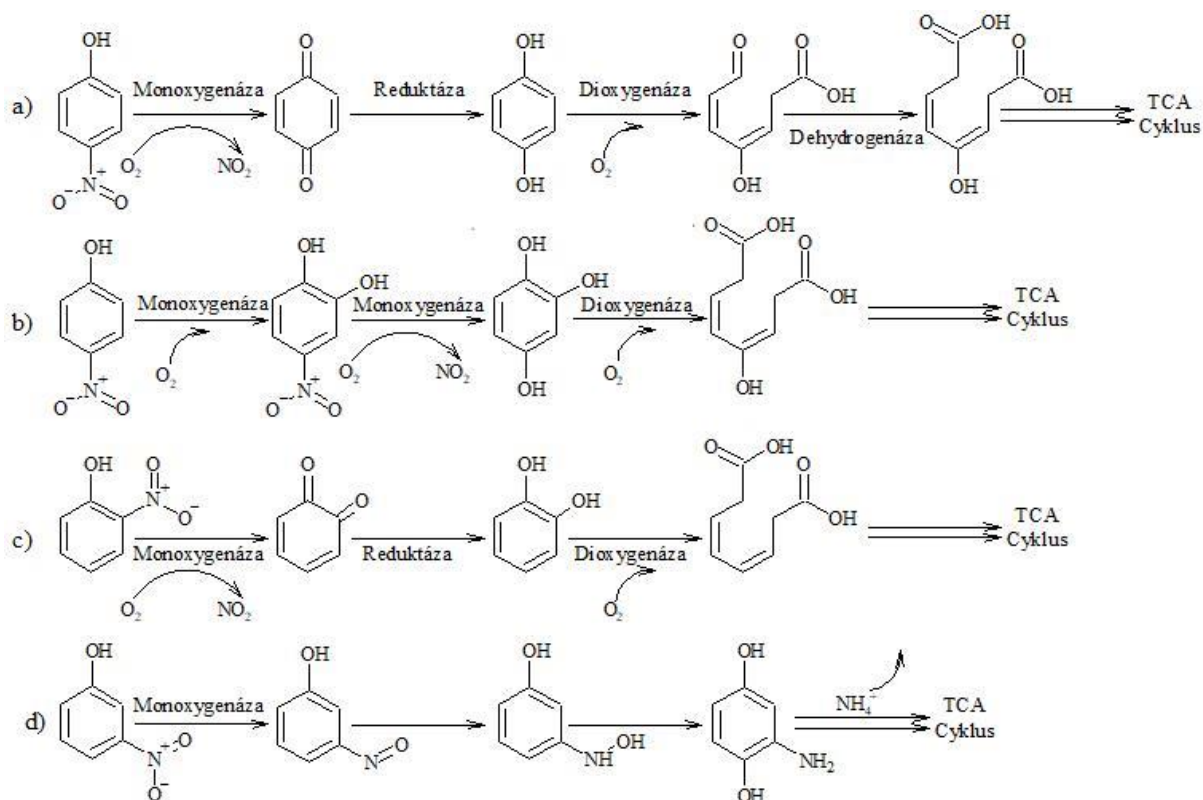
Jednou z možností jak šetřit životní prostředí je nahrazení tradičních plastů biodegradabilními, jako jsou například polyhydroxyalkanoáty. Jak již bylo ale zmíněno v kapitole 2.1.3.1, použití takových plastů je stále limitováno vysokou výrobní cenou. Možností jak zvýšit efektivitu výroby PHA by mohlo být využití zdraví škodlivých aromatických látek při kultivaci producentů PHA [34]. Aby mohly bakterie rozložit aromatické uhlovodíky, musí destabilizovat benzenové jádro pomocí chemických modifikací. Při aerobní degradaci využívají mikroorganismy kyslík jako konečný akceptor elektronů a jako katalyzátory enzymy monooxygenázy a dioxygenázy. Monooxygenázy jsou schopny oxidovat jak monoaromatické, tak polyaromatické uhlovodíky. Katalyzují reakci kyslíku s benzenovým jádrem, kdy je postupně jeden atom včleněn do cyklu a druhý redukován na vodu, znázorňuje obrázek 6. Dioxygenázy pak umožňují dihydroxylaci aromatického jádra za vzniku cis-dihydrodiolů [35].



Obrázek 6: Bakteriální degradace benzenu [35]

Nitrofenoly obsahují ve své struktuře benzenové jádro, na kterém je vázána hydroxylová ($-\text{OH}$) a nitro ($-\text{NO}_2$) skupina. V závislosti na počtu $-\text{NO}_2$ skupin ve sloučenině se dělí dále na mononitrofenoly a polynitrofenoly. Mezi mononitrofenoly patří o-nitrofenol, m-nitrofenol a p-nitrofenol. První dva zmiňované jsou používány pro výrobu barviv, chemikálií a fungicidů, zatímco p-nitrofenol nachází uplatnění při výrobě pesticidů, analgetik či antipyretik. Tyto látky se v přírodě vyskytují jako polutanty a mohou se tak dostávat i do lidského organismu, kde podléhají transformaci pomocí oxidace či redukce, případně konjugaci s kyselinou glukuronovou a působit toxicky. Mezi toxické účinky nitrofenolů na organismus patří methemoglobinémie, dermatitida, poškození plic, ledvin a nervového systému nebo mutace DNA [36].

Některé bakterie ale mohou tyto nitrosloučeniny rozkládat za vzniku anorganických látek jako je CO_2 . P-nitrofenol je nejrozšířenějším izomerem mononitrofenolů a například bakterie rodu *Pseudomonas* ho mohou rozkládat dvěma způsoby za vzniku nitropyrokatecholu nebo hydrochinonu. Obě látky jsou dále metabolizovány až na intermediáty citrátového cyklu. O-nitrofenol rozkládá bakterie *Pseudomonas putida* za vzniku benzochinonu, pyrokatecholu až na intermediáty odbourávané citrátovým cyklem. M-nitrofenol pak kromě *Pseudomonas putida* degraduje i *C. necator* JMP134 přes hydroxylaminofenol a aminohydrochinon opět na intermediáty citrátového cyklu [36]. Tyto reakce znázorňuje obrázek 7.



Obrázek 7: Bakteriální degradace a) *p*-nitrofenolu b) *p*-nitrofenolu, c) *o*-nitrofenolu, d) *m*-nitrofenolu [36]

2.2.6. Magnetické pole a jeho druhy

Působení magnetického pole na mikroorganismy se řadí mezi méně popsané stresové faktory. Snaha charakterizovat jeho konkrétní vliv na růst a metabolismus mikroorganismů by mohla pomoci při zvyšování propustnosti buněk pro antibiotika, léčbě infekcí způsobených bakteriálním biofilmem či zvýšení produkce cílových metabolitů mikrobiálními buňkami.

2.2.6.1. Magnetismus

Na elektrický náboj v prostoru působí síla, která závisí nejen na poloze náboje, ale i na rychlosti jeho pohybu. Každý bod v prostoru je tak definován dvěma vektorovými veličinami a to elektrickou silou, která určuje složku nezávislou na pohybu náboje, a magnetickou silou, která je na rychlosti pohybu závislá. V každém okamžiku je magnetická síla kolmá na směr rychlosti náboje. Elektrické pole je určováno intenzitou elektrického pole \mathbf{E} , magnetické pole je pak definováno pomocí magnetické indukce \mathbf{B} . Celkovou sílu působící na pohybující se náboj uvádí rovnice:

$$\mathbf{F} = q(\mathbf{E} + \mathbf{v} \times \mathbf{B}), \quad (1)$$

kde q je náboj částice, \mathbf{E} intenzita elektrického pole, \mathbf{v} rychlost částice o náboji q a \mathbf{B} magnetická indukce [37].

Jednotlivé elektrony látek mají orbitální a spinový magnetický dipólový moment. Tyto momenty se vektorově skládají nejen pro konkrétní elektron, ale tato výslednice se dále skládá s ostatními výslednicemi elektronů daného atomu a výslednicemi všech atomů látky. Daný součet pak určuje magnetické vlastnosti látek [38]. Vzhledem k těmto vlastnostem mohou být látky rozděleny do 3 skupin: feromagnetické, diamagnetické a paramagnetické. Pro diamagnetické látky platí, že jejich celkový magnetický moment je nulový. Pokud jsou

umístěny do vnějšího magnetického pole, dochází k indukci magnetických momentů a vniká magnetické pole, jehož směr působení je opačný vůči vnějšímu magnetickému poli. Příkladem diamagnetické látky je bismut [37]. Oproti tomu paramagnetické látky mají nenulové jednotlivé magnetické dipólové momenty i bez přítomnosti vnějšího magnetického pole. Tyto momenty jsou ale náhodně orientovány, a proto daná látka nevytváří magnetické pole. Pokud jsou ale paramagnetika umístěna do vnějšího magnetického pole, dochází k orientaci magnetických momentů, ve směru vnějšího pole, a tím i ke vzniku vnitřního magnetického pole. Pokud je vnější pole odstraněno, navrací se magnetické momenty do neuspořádaného stavu [38]. Jako příklad paramagnetik může být uveden hliník [37]. Feromagnetické vlastnosti jsou typické například pro železo nebo nikl. Jednotlivé dipólové momenty těchto látek tvoří oblasti se silným výsledným magnetickým dipólovým momentem, a pokud jsou umístěny do vnějšího magnetického pole, jsou tyto oblasti uspořádány tak, že je vytvořeno silné magnetické pole dané látky, které se udrží částečně i po odstranění vnějšího magnetického pole [38].

Vznik magnetického pole umožněn dvěma mechanismy, a to pomocí pohybujících se elektricky nabitých částic, které působí jako nosiče náboje ve vodičích, nebo některé elementární částice jako elektrony vytváří kolem sebe magnetické pole bez nutnosti přítomnosti vnějšího elektrického pole. První ze zmiňovaných mechanismů je možno pozorovat u magnetů tvořených cívku, která vznikla navinutím drátu kolem ocelového jádra. Touto cívku prochází elektrický proud a velikost magnetického pole je úměrná velikosti tohoto proudu. Magnety, které vytvářejí magnetické pole bez potřeby elektrického proudu, jsou nazývány permanentní magnety a magnety závislé na přítomnosti elektrického proudu elektromagnety [38].

2.2.6.2. Druhy magnetického pole

Magnetické pole může být rozděleno do několika skupin podle různých parametrů, jako například podle změny magnetické indukce v čase nebo v závislosti na velikosti magnetické indukce [39].

Stacionární magnetické pole je takové, u kterého nedochází ke změně velikosti ani směru indukce v čase. U nestacionárního pole se ale jedna z těchto vlastností mění a dále jej můžeme dělit v závislosti na několika parametrech jako je frekvence, magnetická indukce, případně jeho aplikace v praxi [40]. Odlišnost těchto parametrů má za následek různou reakci biologických systémů. Například bylo zjištěno, že pulzní magnetické pole o různé intenzitě má odlišný vliv na proliferaci buněk. Vhodnější pro studium biologických systémů je stacionární magnetické pole, které nemá tolik parametrů s možností lišit se. Toto pole má ale také poměrně menší vliv na organizmy, než nestacionární pole [39].

Podle velikosti magnetické indukce může být magnetické pole rozděleno na slabé (<1 mT), mírné (0,001–1 T), silné (1–20 T) a velmi vysoké (>20 T). Tato klasifikace se může ale mírně lišit v závislosti na různých zdrojích. Velikost magnetické indukce je jedním z klíčových faktorů, které způsobují ovlivňování biologických systémů. Například bylo zjištěno, že SMF s indukcí 0,4–9 T snížilo aktivitu EGFR („*Epidermal Growth Factor Receptor*“) a růst rakovinných buněk, slabší magnetické pole ale tento efekt nemělo [39]. Více o vlivu magnetického pole na bakteriální buňky pojednává kapitola 2.3.

Jednou z dalších možností rozdělení druhů magnetického pole může být na homogenní a nehomogenní, v závislosti na tom, jestli je pole prostorově stejnorodé nebo se jeho indukce prostorově liší. Elektromagnet poskytuje homogenní magnetické pole v určité vzdálenosti vzorku od jeho středu. Se zvyšující se vzdáleností od středu pak dochází ke snižování intenzity [39].

2.3. Současný stav řešení problematiky

Tato práce je převážně zaměřena na vliv magnetického pole na mikrobiální buňky. Proto se následující kapitoly věnují právě experimentům, které studovaly toto stresové působení a odpověď bakteriálních buněk.

2.3.1. Inhibice růstu buněk magnetickým polem

Magnetické pole je spojováno s inhibičním vlivem na růst mikroorganismů. Zpomalení dělení buněk souvisí se změnami ve fyziologii, metabolismu a morfologii buněk. Rychlost proliferace je závislá jednak na síle pole a jeho frekvenci, ale také době expozice a typu buněčné kultury [41].

Roku 2017 *Mousavian-Roshanzamir a spol.* publikovali studii o inhibici růstu *Escherichia coli* pomocí SMF. Elektromagnet použitý pro tento experiment tvořila Helmholtzova cívka o vnitřním průměru 20 cm schopná poskytnout magnetické pole o indukci 0–25 mT. Kultivace v poli probíhala na agarových plotnách při teplotě 25 °C po dobu 0, 15, 30, 45, 60, 75 a 90 minut a intenzitou indukce 2, 4, 6, 9, 14, 16, 18 a 20 mT. Po vystavení magnetickému poli byly vzorky kultivovány po dobu 24 hodin při 37 °C a následně proběhlo počítání kolonií. Bylo zjištěno, že při použití pole o 18 mT a 20 mT došlo k inhibici bakteriálního růstu až o 55 CFU/g [41].

Vliv na rychlost růstu buněk a genovou expresi u *E. coli* studovali *Potenza a spol. (2004)*, kdy byly jako zdroj stacionárního magnetického pole použity magnetické disky neodymu o průměru 28,85 mm a tloušťce 10 mm. Tyto disky byly umístěny do polystyrénových desek s otvorem o rozměru disku a následně byly položeny na vyhřívané třepačky pod baňky o objemu 50 ml. Magnetické pole o indukci 300 mT bylo orientováno vertikálně, kdy se sever nacházel ve spodní části tak, aby působilo ve středu baňky. Aby byl studován pouze vliv magnetického pole bez příspěvku elektrické složky, byly třepačky umístěny do Faradayovy klece, s výjimkou motoru třepáček, který byl umístěn mimo klec. Pro tento experiment byla také použita různá média, základní Luria-Bertani médium a modifikovaná obsahující navíc 6 g/l glutamové kyseliny a 4,5 g/l NaCl. Pro kultivaci bylo použito 15 ml kultury o koncentraci 10^2 až 10^3 buněk/ml, teplota 37 °C a inkubace probíhala 50 h. Každých 12 hodin byl sterilně odebrán 1 ml kultury jak ze vzorků vystavených magnetickému poli, tak kontrolních a byla stanovena optická hustota při 600 nm. Odebraný vzorek byl následně vrácen ke zbytku kultury. Vykreslením růstových křivek, grafické závislosti optické hustoty na čase, bylo zjištěno, že při použití základního média nedocházelo k ovlivňování růstu buněk působením SMF. U modifikovaného média se ale růstové křivky již lišily, a docházelo ke snižování obsahu biomasy v odebraných vzorcích [42].

Statické magnetické pole bylo dále využito při studiu růstu bakterií vyskytujících se v odpadních vodách, a to *Escherichia coli* a *Pseudomonas putida* (*Filipič a spol. 2012*). Magnetické pole bylo generováno pomocí cylindrické cívky s 1000 smyčkami drátu o průměru 2 mm, s vnějším průměrem 250 mm, vnitřním 12 mm a výškou 200 mm.

Bakterie byly umístěny na nevodivou desku a kultivace probíhala na Petriho miskách o průměru 90 mm po dobu 1, 2, 3 nebo 4 hodin. Použité magnetické pole bylo o indukci 5, 17 a 50 mT. V průběhu kultivace byla měřena optická hustota při 650 nm a počítány CFU. Bylo zjištěno, že inhibice bakteriálního růstu je reverzibilní. U *E. coli* byla naměřena stejná optická hustota jako u kontrolního vzorku během hodiny po ukončení působení magnetického pole. Největší inhibice růstu probíhala při teplotě ideální pro kultivaci dané bakterie (37 °C případně 28 °C) a indukci 17 mT. S časem docházelo ke snížení poměru CFU vzorku vystavenému magnetickému poli a CFU kontrolního vzorku. Nejmenší vliv mělo pak magnetické pole o 50 mT [43].

2.3.2. Vliv magnetického působení na buněčné membrány

Mírné magnetické pole vykazuje vliv na biologické membrány a to tak, že dochází k zvýšení diamagnetické anizotropie biologických membrán, a tím k reorientaci molekul fosfolipidů. Touto změnou je ale ovlivněn i iontový tok. Iontové kanály jsou tvořeny několika proteinovými podjednotkami a ty by mohly být deformovány, což podporuje zjištění, že magnetické pole inhibuje mechanismus aktivace Ca^{2+} kanálů. Spolu s Ca^{2+} kanály dochází k inhibici i Na^{+} kanálů, tato změna ale není tak markantní [44].

Vliv na transport Ca^{2+} studoval *Miyakoshi a spol* roku 2005 například u GH3 buněk. Pole o 120 mT způsobilo snížení píku amplitudy proudu Ca^{2+} a posun v závislosti proudu a napětí. U stejného typu buněk byl zjištěn také posun v závislosti proudu a napětí spolu s redukcí píku proudu působením 125 mT v sodném kanálu aktivovaném napětím [45].

Stacionární magnetické pole ovlivňuje také složení buněčné membrány. Tento jev studoval *Mihoub a spol.* (2012) například u bakterie *Salmonella enterica*, konkrétně u kmenů *Salmonella thyphimurium* WT („Wild Type“) a její mutantní formy *dam*. Pro kultivaci bylo použito médium Nutrient Broth a její první část probíhala v 10 ml média při 37 °C do druhého dne. Následně byla kultura zředěna v dalších 50 ml média. Vzorky pro určení viability buněk byly odebírány po 2, 4, 6, 8 a 10 hodinách kultivace a byly stanoveny hodnoty CFU/ml. Stacionární magnetické pole bylo vytvářeno pomocí 2 cylindrických cívek o průmětu 20 cm a délce 13 cm. Vzorek byl umístěn do dvojité Erlenmeyerovy baňky mezi obě cívky tak, aby byla v jejím středu velikost indukce 200 mT a teplota 37 °C, ta byla udržována pomocí cirkulace vody v dvojité baňce. Ze stanovených růstových křivek bylo zjištěno, že u obou kmenů došlo k výraznému poklesu CFU/ml po 6 hodinách kultivace za působení SMF. U *S. thyphimurium* WT následně tato hodnota vzrostla po 8 a 10 hodinách, zatímco u mutantního kmene zůstala téměř nezměněná. Pro analýzu složení membránových lipidů pak byly odebrány vzorky po 3, 6 a 9 hodinách kultivace. Kontrolní vzorky *S. thyphimurium* obsahovaly ve své membráně nejvíce fosfatidylethanolaminy (PE), dále pak fosfatidylglyceroly (PG) a kardiopilin (CL) v procentuálním zastoupení 76 %, 16,5 % a 6,5 % u mutantního kmene bylo pak 48,9 %, 23,2 % a 28,2 %. U bakterií kultivovaných v magnetickém poli bylo zjištěno, že kmen *S. thyphimurium* WT obsahoval nižší množství PE ve srovnání s kontrolním vzorkem, zatímco obsah PG i CL byl vyšší, pro CL až trojnásobný. S dobou působení magnetického pole množství PG dále vzrůstalo, ale u CL docházelo ke snižování obsahu. V membránách mutantního kmene poměr PE klesl, množství PG také kleslo po 3 hodinách kultivace, mezi 6 a 9 hodinami ale výrazně vzrostlo a obsah CL po 3 hodinách vzrostl, ale po 6 jeho hodnota klesla [46].

2.3.3. Stacionární magnetické pole a ROS

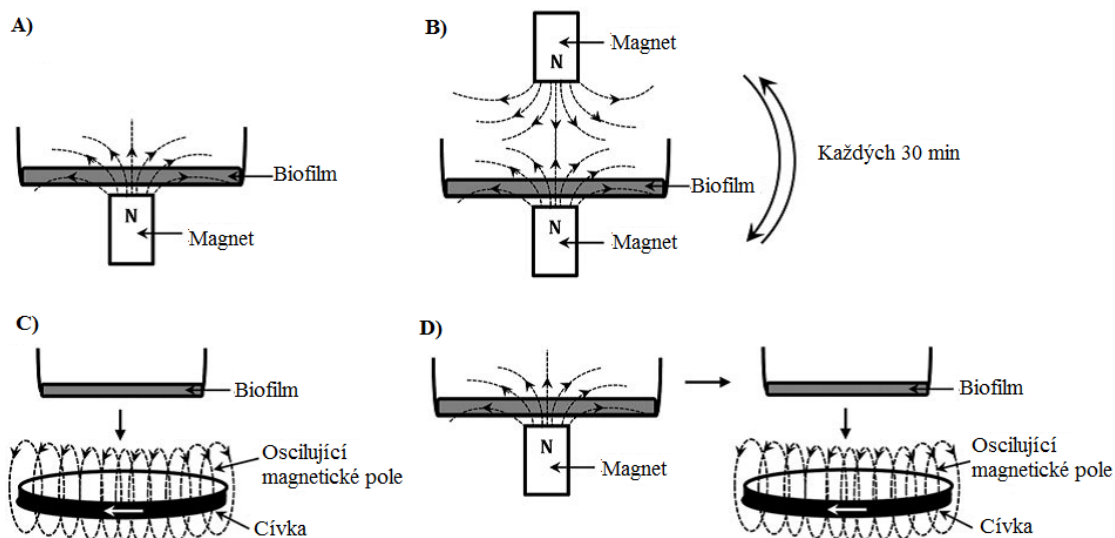
Existují důkazy, že magnetické pole může ovlivňovat reaktivní formy kyslíku (ROS), nicméně experimentální výsledky se liší v závislosti na použitém magnetickém poli, zkoumaných biologických systémech i uspořádání experimentu. Při použití stacionárního pole většina studií dokázala zvýšení hladiny ROS například u nádorových buněk, některé studie ale dokazovaly opak nebo žádný efekt, například u bakterií *E. coli* a *S. aureus* [40].

Pro tuto studii z roku 2013 *Bajpai a spol.* použili elektromagnet tvořen měděným vláknem o průměru 1,5 mm s 875 smyčkami okolo železného jádra, schopný vytvořit stacionární magnetické pole o 0,01–0,1 T. Kultivace probíhala na agarových plotnách v inkubátoru o teplotě 27 °C. Magnetické pole o indukcii 100 mT bylo aplikováno v několika různých intervalech a do použitého média byl přidáván hydroxapatit spolu s různými koncentracemi Fe_3O_4 ($\text{HA-xFe}_3\text{O}_4$). Plotny z prvního cyklu byly kultivovány 2 hodiny bez SMF, následovalo 30 minut expozice v magnetickém poli a 90 minut kultivace bez vlivu pole. Další experiment byl proveden kultivací 2 hodiny bez použití SMF a 2 hodinami kultivace v magnetickém poli. Poslední vzorky byly kultivovány 4 hodiny pouze v magnetickém poli. Následně byly vzorky promyty, aby byly odstraněny slabě ulpělé buňky a byly provedeny testy na viabilitu buněk, integritu membrány a přítomnosti ROS. Bylo zjištěno, že se zvyšující se dobou expozice magnetickému poli a koncentrací magnetických částic se snižovala viabilita buněk, docházelo k narušování buněčné membrány, ale tvorba ROS se zvyšovala pouze se vzrůstající koncentrací $\text{HA-xFe}_3\text{O}_4$ nezávisle na době působení SMF [47].

2.3.4. Efekt magnetického pole na bakteriální biofilm

Vznik bakteriálního biofilmu je spojen se snížením schopnosti antibiotik pronikat do buněk. Použití magnetického pole, ale může pomoci zvýšit jejich účinnost. Tento efekt byl zkoumán například u biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a antibiotika ciprofloxacinu. *Bandara a spol.* roku 2015 pro kultivaci biofilmu použili polystyrenové mikrotitrační desky s 96 jamkami a pro testy byly použity kultury staré 24 h, kultivované při 37 °C a 75 rpm. Jako zdroj magnetického pole byl použit jednak permanentní magnet o 4,44 kG, ale také elektromagnet tvořen cívkou magneTherm o frekvenci 474 kHz. Magnetické pole bylo aplikováno v několika uspořádáních, které znázorňuje obrázek 8. První experiment (část A) byl realizován umístěním desky s kulturami na magnet a následnou kultivací po dobu 6 h. Další (část B) využíval také stacionární magnetické pole a to tak, že po dobu 6 h se měnilo umístění magnetu nad a pod deskou každých 30 min. Oscilující magnetické pole bylo vytvářeno pomocí cívky (část C) a vzorek byl umístěn do jejího středu, s následnou kultivací po dobu 30 min. Jako poslední byla použita kombinace obou typů magnetického pole a to tak, že byl biofilm vystaven statickému magnetickému poli jako v experimentu A po dobu 1 h a následně byl vzorek umístěn do cívky a dále kultivován po dobu 30 min [48].

Po vystavení magnetickému poli následovala další kultivace biofilmu po dobu 24 h při 37 °C. Buňky pak byly dvakrát promyty PBS (fosfátový pufr s fyziologickým roztokem) a byly provedeny testy na viabilitu buněk a kvantifikaci biomasy biofilmu pomocí krystalové violeti. Všechna použitá uspořádání vykazovala redukci metabolické aktivity bakteriálních buněk, nejvíce pak uspořádání B. Snížení viability buněk je spojeno s buněčnou smrtí a snížení množství biomasy pak nejen s buněčnou smrtí ale i ztrátou extracelulární matrix bakteriálního biofilmu. Dále mělo magnetické pole negativní vliv na strukturu biofilmu [48].



Obrázek 8: Jednotlivá uspořádání experimentu [48]

Zlepšení působení antibiotik díky magnetickému poli studovali *Junka a spol. (2018)* také s použitím rotačního magnetického pole (RMF), tedy pole, u kterého se mění umístění magnetických pólů okolo centrálního bodu, případně osy. Pro tvorbu bakteriálního biofilmu byly použity *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Kultivace probíhala na agarových plotnách po dobu 24 h při 37 °C. Následně byla právě jedna kolonie tvořící jednotka přenesena do tekutého média a kultivována dalších 24 h při 37 °C a 200 rpm. Kultury byly pak zředěny čistým médiem na stejnou optickou hustotu a 10 ml bylo použito pro zaočkování 100 ml média. To bylo přeneseno na desku s 24 jamkami a následovala kultivace po dobu 48 h při 37 °C a výměně média každých 12 h. Magnetické pole bylo vytvářeno pomocí cívek umístěných okolo válce a osy nasměrovány podél jeho poloměru. Frekvence magnetu byly měněny mezi hodnotami 10 a 50 Hz a hodnoty magnetické indukce byly vypočítány pro každý vzorek, např. pro 10 Hz byla maximální hodnota indukce 23 mT nebo pro 50 Hz 34 mT. Teplota kultivace byla kontrolována termostatem na 37 °C. Pro experimenty bylo použito několik uspořádání: vystavení bakteriálního biofilmu RMF po dobu 1 h s médiem obsahujícím gentamicin případně ciprofloxacin, působení RMF 1 h a následná inkubace 17 h v médiu obsahující antibiotika, působení RMF na biofilm spolu s antiseptikem po dobu 5 min a vystavení RMF po dobu 1 h s následnou kultivací 5 min s použitím antiseptika. U všech těchto experimentů docházelo k výraznému zvýšení působení antimikrobiálních látek, se zvyšující se frekvencí pak byl účinek vyšší. S vyšší frekvencí mohlo docházet k elektroporaci a poškození membrán. Antimikrobiální látky tedy mohly snadněji prostupovat do buněk [49].

Biofilm tvořen bakterií *Enterococcus faecalis* studovali také *Fan a spol.* v roce 2018, a to konkrétně vliv alkalického pH a stacionárního magnetického pole, vytvářeno pomocí permanentního NdFeB magnetu o rozměrech 50x20x10 mm a indukci 170 mT, na který byla umístěna baňka s médiem. Bakterie byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 h na agarových plotnách. Jednotlivé kolonie byly přeneseny do tekutého média a kultivovány do druhého dne. Následně při ředění 1:100 v čistém médiu byly bakterie kultivovány do optické hustoty 1 při 600 nm. Po ukončení kultivace byly odebrány 4 vzorky o 20 ml, odstředěny při 2500 g, 6 min

a 4 °C a bakteriální usazenina rozsuspendována v 20 ml média o pH 7 a 9. Další kultivace probíhala po dobu 24, 48, 72, 120 a 168 h jak s použitím magnetického pole, tak bez něj jako kontrolní vzorky. Po ukončení kultivace bylo použito desítkové ředění pro zjištění viability buněk formou CFU/ml. Následně byla míra přežití buněk vypočítána jako poměr průměrné hodnoty CFU při působení magnetického pole a průměrné hodnoty CFU kontrolních vzorků. Výraznější snížení viability buněk bylo zjištěno až po 5. dni kultivace a rozdíl byl také vyšší při kombinaci působení pH 9 a SMF. Na rozdíl od viability buněk byla ale tvorba bakteriálního biofilmu mírně zvýšena působením magnetického pole a zvýšeného pH. Index tvorby biofilmu byl sice zvýšen působením SMF a pH, ale s časem nerostl a jeho hodnoty byly stále příliš nízké pro to, aby mohly být kultury definovány jako biofilm tvořící [50].

Odstranění biofilmu pomocí elektromagnetického pole o extrémně nízkých frekvencích bylo studováno roku 2017 u bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus epidermidis*. *Karaguler a spol.* kultivovali biofilm na mikrotitračních deskách po dobu 24 a 48 h při 28 °C tak, že 10 µl kultury bylo zaočkováno do 5 ml Tryptic Soy Broth média a kultivováno do dosažení stacionární fáze. Následně byl vzorek zředěn médiem v poměru 1:100 a 100 µl bylo přeneseno do jednotlivých jamek na desce. Magnetické pole bylo vytvářeno pomocí solenoidu s průměrem 160–170 mm tvořeného měděným drátem s 180 smyčkami. Frekvence pole ve středu cívky se pohybovala v rozmezí 50–120 Hz a indukce 0,1–1,0 mT. Pro daný experiment pak byly použity frekvence 50 a 100 Hz s indukcí 1 mT a vzorky byly poli vystaveny po celou dobu kultivace. Obsah biomasy byl stanoven jako hodnota optické hustoty při 585 nm za použití barvení krystalovou violetí. U obou bakterií došlo působením pole o frekvenci 50 Hz ke snížení množství přisedlých biofilmových buněk. Po 48 hodinách jejich množství opět vzrostlo, ale stále bylo nižší než u kontrolních vzorků. Při použití frekvence 100 Hz u obou bakterií ale nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi kontrolními vzorky a těmi, které byli poli vystaveny [51].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité bakterie

V práci byly použity bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16, získaný z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně, a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, zakoupený v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

3.1.2 Použité chemikálie

Benzen, Lachema

BODIPY 439/503, Thermo Fisher Scientific

Nilská červeň, Sigma Aldrich

P-nitrofenol, Sigma-Aldrich

P(3HB), Sigma-Aldrich

Propidium jodid, eBioscience

Všechny ostatní použité chemikálie byly čistoty p.a. a vyšší.

3.1.3 Použité přístroje

Analytické váhy, Boeco

Centrifuga EBA 200, Hettich Zentrifugen

Elektromagnet, sestaven při experimentu: *Mikrovlnný magnetoaktivní zdroj plazmatu* [52]

ELISA reader BioTek ELx808, BioTek

Infračervený spektrometr Nicolet iS50 ATR, ThermoScientific

Laminární box Aura mini, BioAir Instruments

Mikrocentrifuga Sigma 1-14, Sigma Laborzentrifugen

Optický mikroskop Eclipse E200 s epifluorescenčním nástavcem a CCD kamerou PixelLink PL-A662, Nikon

Permanentní magnet 5,5x3,0x1,0 cm

Plynový chromatograf s FID Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm

Průtokový cytometr Apogee A50, Apogee Flow Systems

Předvážky EW 620, Kern

Templerované třepačky Heindolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.

Termoblok SBH130D, Stuart

Spektrofotometr Spectronic Helios Delta, Thermo Fisher Scientific

3.2 Kultivace bakterií a analýzy

3.2.1 Příprava inokula

Pro přípravu inokula bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bylo použito živné médium Nutrient Broth o koncentraci 25 g/l a složení:

Pepton	10 g
Beef extract	10 g
NaCl	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tekutá média o objemu 50 ml byla v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml sterilizována v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem 35 minut. Po sterilaci byla média ochlazená na pokojovou teplotu a ve sterilním laminárním boxu Aura mini (BioAir Instruments) očkovaná bakteriálním kmenem z agarových ploten pomocí sterilní očkovací kličky. Takto připravené kultury byly kultivovány na temperovaných třepačkách Heindolph Unimax 1010 (Labicom s.r.o.) při 30 °C a 180 rpm po dobu 24 hodin.

3.2.2 Stanovení růstových křivek v magnetickém poli

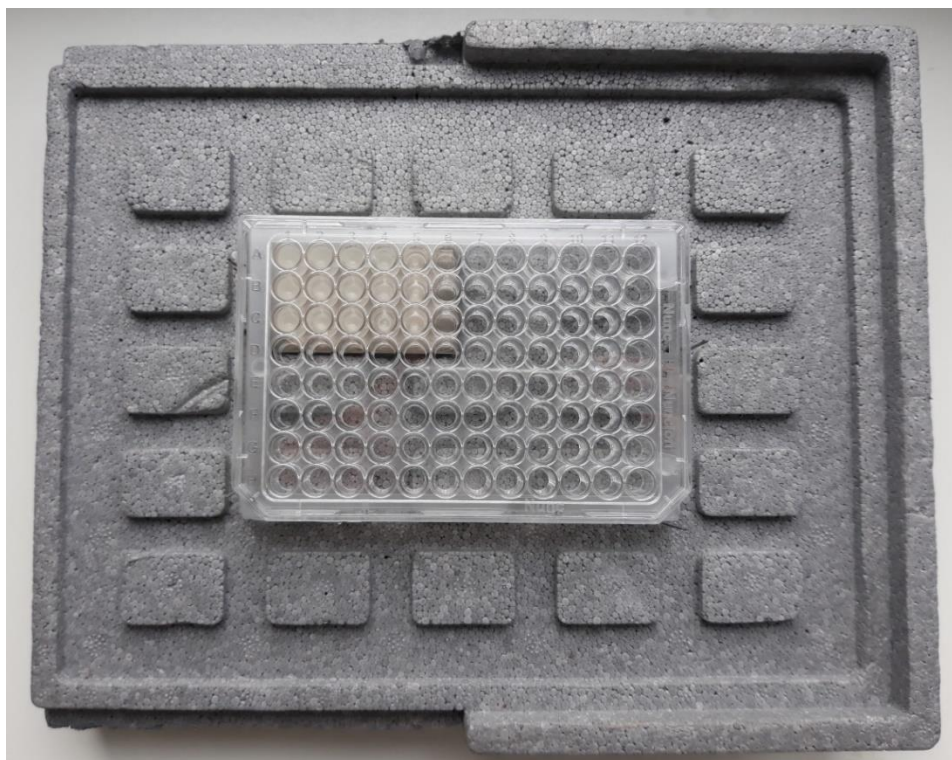
Pro měření růstových křivek byly bakterie *Cupriavidus necator* H16 i *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ kultivovány v médiu Nutrient Broth (složení viz 3.2.1) a minerálním médiu o složení:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tekutá média o objemu 100 ml byla sterilizována v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 35 minut. Po sterilaci byla média ochlazená na pokojovou teplotu a ve sterilním laminárním boxu Aura mini (BioAir Instruments) bylo do minerálního média přidáno 5 ml sterilního roztoku fruktózy o koncentraci 400 g/l (pro konečnou koncentraci fruktózy v médiu 20 g/l) a 0,1 ml sterilního roztoku stopových prvků MES o složení:

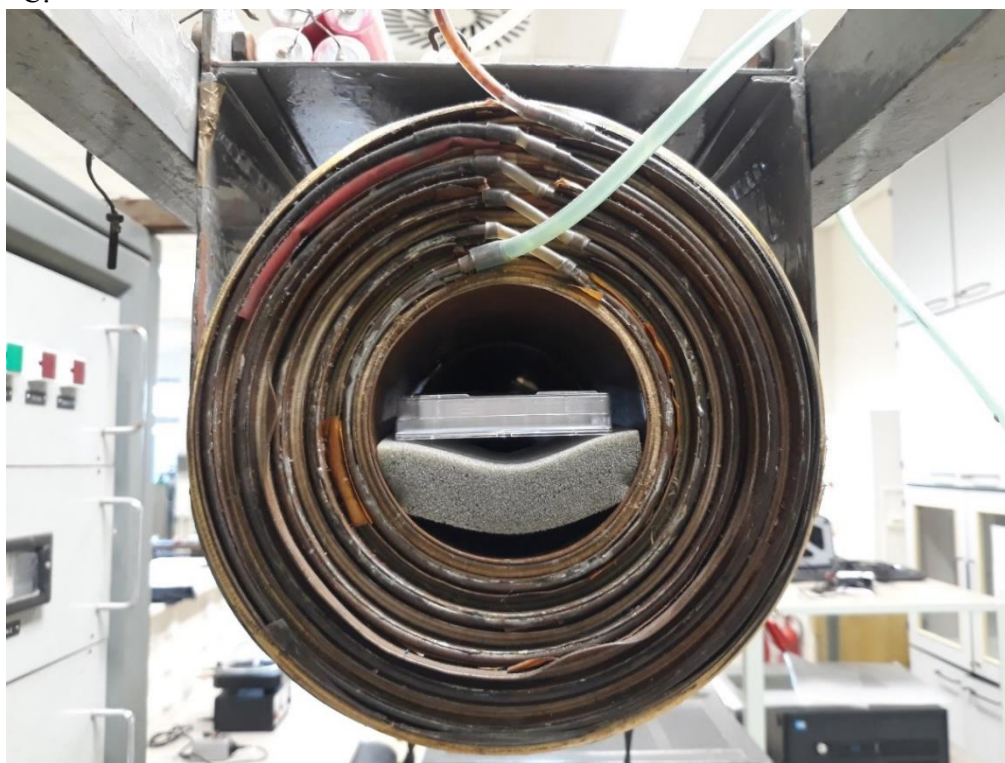
FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
HCl (0,1 mol/l)	1000 ml

Média byla očkována 5 ml inokula a bylo odebráno 200 µl takto připravených kultur do jednotlivých jamek mikrotitračních destiček. Pro kultivaci za použití permanentního magnetu byla jedna destička umístěna na magnet (viz obrázek 9) a společně s ním probíhala kultivace na temperované třepačce Heindolph Unimax 1010 (Labicom s.r.o.). Druhá kontrolní destička byla umístěna samostatně na temperované třepačce Heindolph Unimax 1010 (Labicom s.r.o.). Jednotlivé kultivace probíhaly při 30 °C a 180 rpm.



Obrázek 9: Umístění mikrotitrační destičky na permanentní magnet

Při kultivaci za použití elektromagnetu byla jedna destička umístěna do cívky (viz obrázek 10) a druhá kontrolní volně na stůl. Kultivovány byly při pokojové teplotě, přibližně 23 °C.



Obrázek 10: Umístění mikrotitrační destičky do elektromagnetu

Během kultivací byla po dobu 72 hodin pravidelně měřena absorbance vzorků při vlnové délce 630 nm pomocí přístroje ELISA reader BioTek ELx808 (BioTek).

3.2.3 Stanovení IR spektra při kultivaci v magnetickém poli

Pro stanovení IR spektra bakterie *Cupriavidus necator* H16 při kultivaci na permanentním magnetu byly připraveny kultury v minerálním médiu, pro kultivaci v elektromagnetu i v médiu Nutrient Broth, a to postupem uvedeným v kapitole 3.2.2.

Z destičky kultivované v magnetickém poli i za optimálních podmínek byly po 72 hodinách odebrány vzorky z jednotlivých jamek do zkumavek typu Eppendorf a centrifugovány pomocí mikrocentrifugy Sigma 1-14 (Sigma Laborzentrifugen) po dobu 5 minut při 5000 rpm. Byl slit supernatant a následně byly buňky dvakrát promyty 1 ml 50 mmol/l fosfátového pufru o pH 7,4 a složení:

NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	1,761 g
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	6,89 g
Destilovaná voda	1000 ml

U takto připravený vzorků byla provedena analýza pomocí infračerveného spektrometru s Fourierovou transformací Nicolet iS50 ATR (ThermoScientific).

3.2.4 Analýza na úrovni jedné buňky

Pro analýzu obsahu PHA v buňkách při růstu v magnetickém poli byla bakterie *Cupriavidus necator* H16 kultivována v minerálním médiu na permanentním magnetu a za optimálních podmínek postupem uvedeným v kapitole 3.2.2.

Po 72 hodinách byly z jednotlivých jamek destiček odebrány vzorky do zkumavek typu Eppendorf a centrifugovány pomocí mikrocentrifugy Sigma 1-14 (Sigma Laborzentrifugen) 5 minut při 5000 rpm. Byl slit supernatant a buňky byly rozsuspendovány v 1 ml pufru PBS o složení:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	1,44 g
Destilovaná voda	1000 ml

Po centrifugaci 2 minuty při 8000 rpm byl opět slit supernatant a k biomase byl napipetován 1 ml 20% roztoku ethanolu o teplotě 4 °C. Takto připravené vzorky byly umístěny na 10 minut do lednice. Následně byly vzorky dvakrát promyty 1 ml pufru PBS a pomocí desítkového ředění zředěny v poměru 1:100.

Obsah PHA byl sledován pomocí optického mikroskopu Eclipse E200 (Nikon) s přídatkem 5 µl BODIPY 439/503 a průtokového cytometru Apogee A50 (Apogee Flow Systems) s přídatkem 5 µl nilské červeně. Fluorescenční sondy byly připraveny jako roztoky v DMSO o koncentraci 1 mg/ml.

3.2.5 Stanovení růstových křivek v magnetickém poli a osmotickém stresu

Pro stanovení růstových křivek při osmotickém stresu byla použita bakterie *Cupriavidus necator* H16 při kultivaci na permanentním magnetu, v elektromagnetu pak *Cupriavidus necator* H16 i *Cupriavidus necator* PHB⁴. Ke složkám minerálního média byl navážen také přídatek NaCl tak, aby vznikly roztoky s koncentrací soli 0; 5; 10; 15 a 20 g/l. Kultury byly pak připraveny a zaočkovány do mikrotitračních destiček postupem uvedeným v kapitole 3.2.2. Během kultivací byla po dobu 72 hodin pravidelně měřena absorbance vzorků při vlnové délce 630 nm pomocí ELISA readeru BioTek ELx808 (BioTek).

3.2.6 Stanovení růstových křivek v přítomnosti organických polutantů

Pro kultivaci bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ v přítomnosti organických polutantů bylo použito 100 ml minerálního média v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml připraveného způsobem popsáním v kapitole 3.2.2 s přidavkem benzenu či p-nitrofenolu tak, že vznikly roztoky o koncentracích 0; 10; 50; 100 a 250 mg/l organické látky. Kultury byly kultivovány na temperovaných třepačkách Heindolph Unimax 1010 (Labicom s.r.o.) při 30 °C a 180 rpm po dobu 72 hodin.

V průběhu kultivace byl pravidelně odebírán 1 ml kultury ve sterilním laminárním boxu a následně změřen pomocí spektrofotometru Spectronic Helios Delta (Thermo Fisher Scientific) při vlnové délce 630 nm.

3.2.7 Stanovení viability buněk pomocí průtokového cytometru

Pro analýzu viability buněk na průtokovém cytometru byly bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ ve 100 ml minerálního média (kapitola 3.2.2) kultivovány v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml na temperovaných třepačkách Heindolph Unimax 1010 (Labicom s.r.o.) při 30°C a 180 rpm po dobu 72 hodin.

Následně bylo odebráno 10 ml kultur do centrifugačních zkumavek, centrifugováno 5 minut při 5000 rpm a dvakrát promyto 10 ml pufru PBS. Do 10 ml promytých buněk v PBS byl přidán p-nitrofenol (zásobní roztok o koncentraci 10 g/l) tak, aby vznikly roztoky o koncentracích 250 a 1000 mg/l. Po dobu 2 hodin byl každých 30 minut odebírán 1 ml kultury do zkumavek typu Eppendorf, centrifugován pomocí mikrocentrifugy Sigma 1-14 (Sigma Laborzentrifugen) 5 minut při 5000 rpm a dvakrát promyt 1 ml pufru PBS pro odstranění p-nitrofenolu. Promyté vzorky byly dále zředěny v poměru 1:20 a bylo přidáno 5 µl roztoku propidium jodidu o koncentraci 1 mg/ml. Následně byla provedena analýza viability buněk pomocí průtokového cytometru Apogee A50 (Apogee Flow Systems).

3.2.8 Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie

3.2.8.1 Příprava kalibrační řady

Roztoky pro kalibrační řadu byly připraveny pomocí zásobního roztoku P(3HB). Nejprve bylo naváženo určité množství P(3HB), které byl přidáno do vialky se 4 ml chloroformu a vialka byla umístěna na 20 minut do termobloku SBH130D (Stuart) při teplotě 70 °C. Zásobní roztok byl následně ředěn ve vialkách tak, aby vznikly roztoky o objemu 1 ml a koncentraci 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 mg/ml. Do vialek bylo dále napipetováno 0,8 ml 15% roztoku kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly uzavřeny a umístěny po dobu 3 hodin do termobloku SBH130D (Stuart) při teplotě 93 °C. Poté byly roztoky extrahovány přidavkem 0,5 ml NaOH o koncentraci 0,05 mol/l. Po oddělení fází bylo do vialek s 950 µl chloroformu napipetováno 50 µl spodní, chloroformové, fáze a vzorky byly analyzovány pomocí plynového chromatografu Trace 1300 (Thermo Scientific) s plamenovým ionizačním detektorem.

3.2.8.2 Příprava vzorků

Obsah polyhydroxyalkanoátů byl stanoven u kultur s obsahem 0; 10 a 50 mg/l p-nitrofenolu, kultivovaných podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.6. Z těchto vzorků bylo odebráno 10 ml suspenze do centrifugačních zkumavek, centrifugováno pomocí centrifugy EBA 200 (Hettich Zentrifugen) 5 minut při 5000 rpm a následně dvakrát promyto

destilovanou vodou. Poslední supernatant byl slit a biomasy jednotlivých vzorků byly umístěny do termostatu pro vysušení do konstantní hmotnosti.

Po vysušení byla biomasa zvážena a do vialek bylo odebráno 10 mg. K navážce byl napipetován 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% roztoku kyseliny sírové v methanolu, vialky byly uzavřeny a umístěny po dobu 3 hodin do termobloku SBH130D (Stuart) při 93 °C. Dále byly roztoky extrahovány 0,5 ml roztoku NaOH o koncentraci 0,05 mol/l. Do vialek s 950 µl chloroformu bylo následně po oddělení fází odebráno 50 µl spodní, chloroformové, fáze. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí plynového chromatografu Trace 1300 (Thermo Scientific)s plamenovým ionizačním detektorem.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Vliv magnetického pole

4.1.1 Rozdíl vlivu permanentního magnetu a elektromagnetu

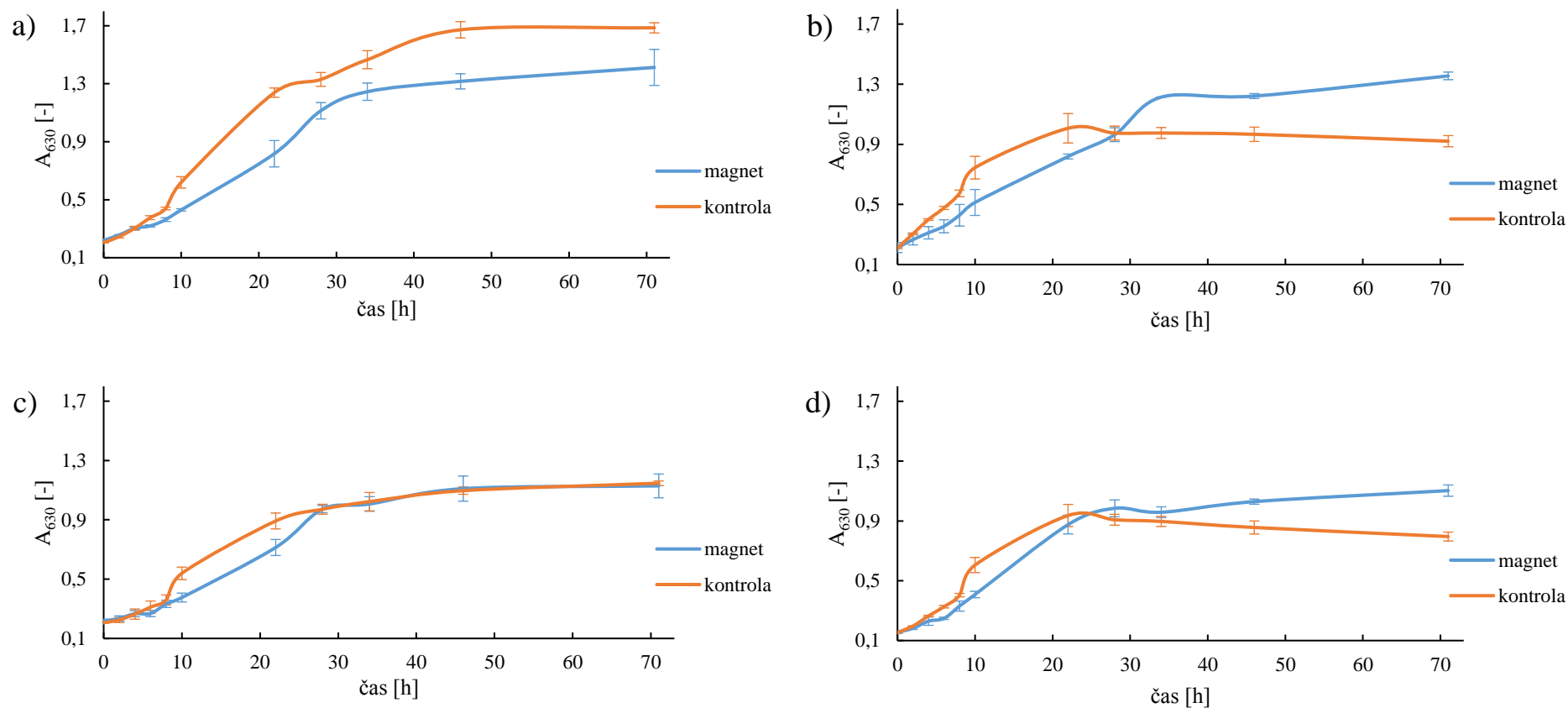
Vliv magnetického pole na růst mikrobiálních buněk byl studován pro PHA produkující bakterii *Cupriavidus necator* H16 a mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, který PHA nevytváří. Tyto dva kmeny bakterií byly vybrány za účelem porovnání protektivních účinků PHA, když se mikroorganismy nacházejí ve stresovém prostředí. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.1, to, jakým způsobem bude magnetické pole buňky ovlivňovat, závisí mimo jiné na velikosti magnetické indukce použitého magnetu. Proto byly pro tento experiment použity dva typy magnetu: permanentní magnet o velikosti magnetické indukce v řádu desítek mT a elektromagnet o velikosti magnetické indukce v řádu stovek mT. Kromě různých druhů magnetického pole byl sledován také vliv použitého kultivačního média a to minerálního média, podporujícího tvorbu PHA v bakteriálních buňkách, a komplexního média Nutrient Broth, které produkci PHA nepodporuje. Pro stanovení tohoto vlivu byly sestaveny růstové křivky a to tak, že byla vynesena závislost absorbance při vlnové délce 630 nm stanovená pomocí přístroje ELISA reader BioTek ELx808 (BioTek) na čas. Obrázek 11 znázorňuje růstové křivky pro permanentní magnet a obrázek 12 pro elektromagnet.

Při kultivaci bakterií v poli vytvářeném permanentním magnetem a minerálním médiu je možné u bakterie *C. necator* H16 pozorovat inhibici růstu buněk ve všech růstových fázích (viz obrázek 11a), pro *C. necator* PHB⁻⁴ pak inhibici v exponenciální fázi a vyrovnání množství biomasy ve stacionární fázi (viz obrázek 11c). Při kultivaci v médiu Nutrient Broth docházelo u obou bakterií k inhibici růstu v magnetickém poli v exponenciální fázi a následně ve stacionární došlo k poklesu růstu u kontrolního vzorku vzhledem ke vzorku, který byl vystaven stresovému působení (viz obrázek 11b, d).

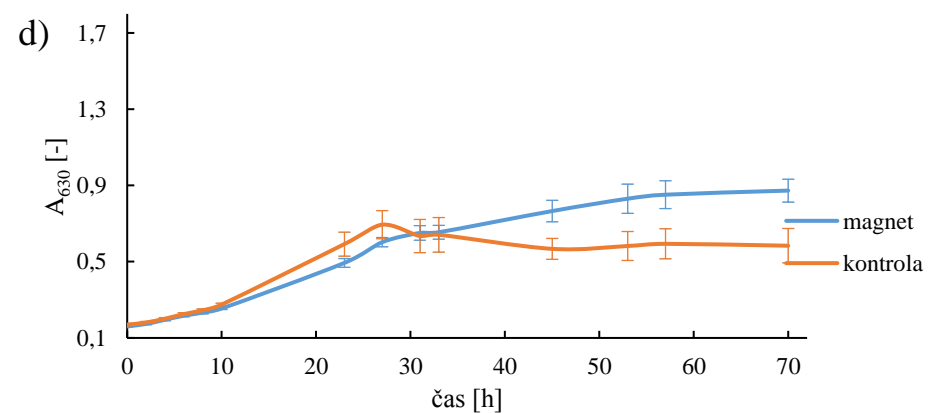
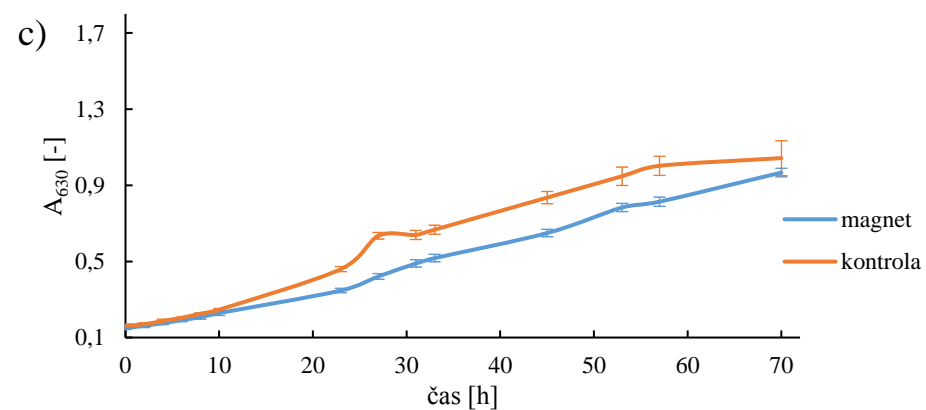
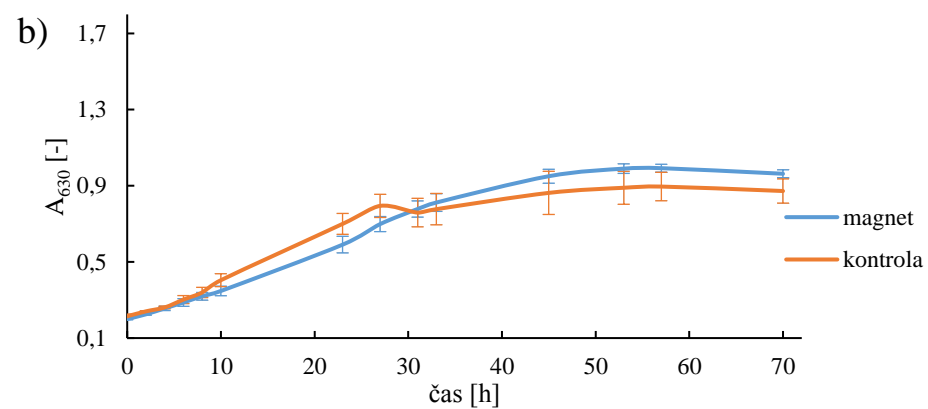
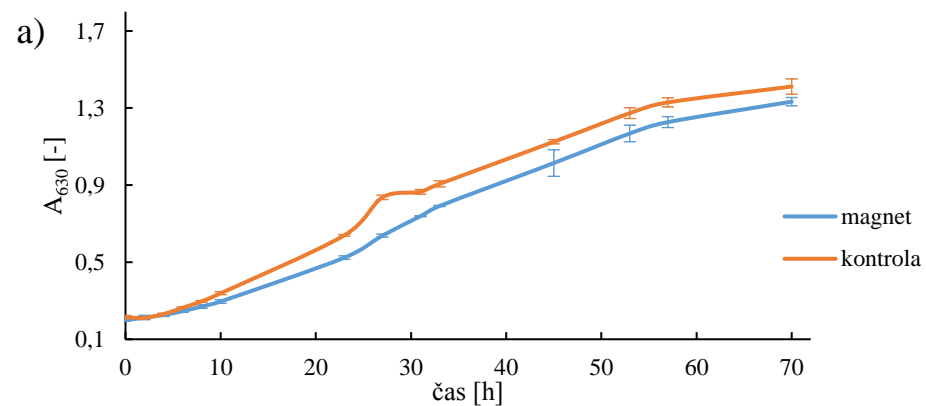
Podobný trend lze pozorovat i při použití elektromagnetu, kdy růst *C. necator* H16 i *C. necator* PHB⁻⁴ byl v minerálním médiu inhibován ve všech růstových fázích (viz obrázek 12a, c). V médiu Nutrient Broth po inhibici růstu magnetickým polem v exponenciální fázi došlo ke zvýšení obsahu biomasy nad hodnoty kontrolního vzorku ve fázi stacionární (viz obrázek 12b, d).

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.1 nižší růst bakterií v magnetickém poli bývá spojován se změnou fyziologie buněk, často s poškozováním funkce buněčné membrány. Rozsah inhibice je závislý mimo jiné i na velikosti magnetické indukce daného pole [39]. Použitý permanentní magnet vytváří poměrně slabé magnetické pole, což mohlo být důvodem vyrovnání obsahu biomasy bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ kultivované v minerálním médiu. U *Cupriavidus necator* H16 mohla přítomnost polyhydroxyalkanoátů v buňkách růst negativně ovlivňovat, případně bakterie mohly využít energii právě spíše pro tvorbu polyhydroxyalkanoátů než pro růst. Médium Nutrient Broth na rozdíl od minerálního nevytváří pro bakterie prostředí vhodné pro produkci polyhydroxyalkanoátů a pravděpodobně proto je možné pozorovat u obou bakteriálních kmenů podobné chování při vystavení magnetickému poli. Inhibice růstu vlivem magnetického pole mohla způsobit pomalejší vyčerpávání zdroje uhlíku z média, prodloužení exponenciální fáze růstu a následně vyšší konečný obsah biomasy než v kontrolních vzorcích. Nižší hodnoty absorbance u všech

vzorků při použití elektromagnetu v porovnání s permanentním magnetem mohly být způsobeny nižší teplotou kultivace, než je optimum pro *Cupriavidus necator* případně mohl být růst ovlivněn i tím, že destičky v elektromagnetu nebyly třepány a tím byly buňky více limitovány obsahem kyslíku.



Obrázek 11: Růstové křivky při kultivaci bakterií za použití permanentního magnetu pro a) *C. necator* H16 minerální médium, b) *C. necator* H16 Nutrient Broth, c) *C. necator* PHB⁻⁴ minerální médium, d) *C. necator* PHB⁻⁴ Nutrient Broth



Obrázek 12: Růstové křivky pro kultivaci bakterií za použití elektro magnetu pro a) *C. necator* H16 minerální médium, b) *C. necator* H16 Nutrient Broth, c) *C. necator* PHB⁻⁴ minerální médium, d) *C. necator* PHB⁻⁴ Nutrient Broth

4.1.2 Vliv magnetického pole společně s osmotickým stresem

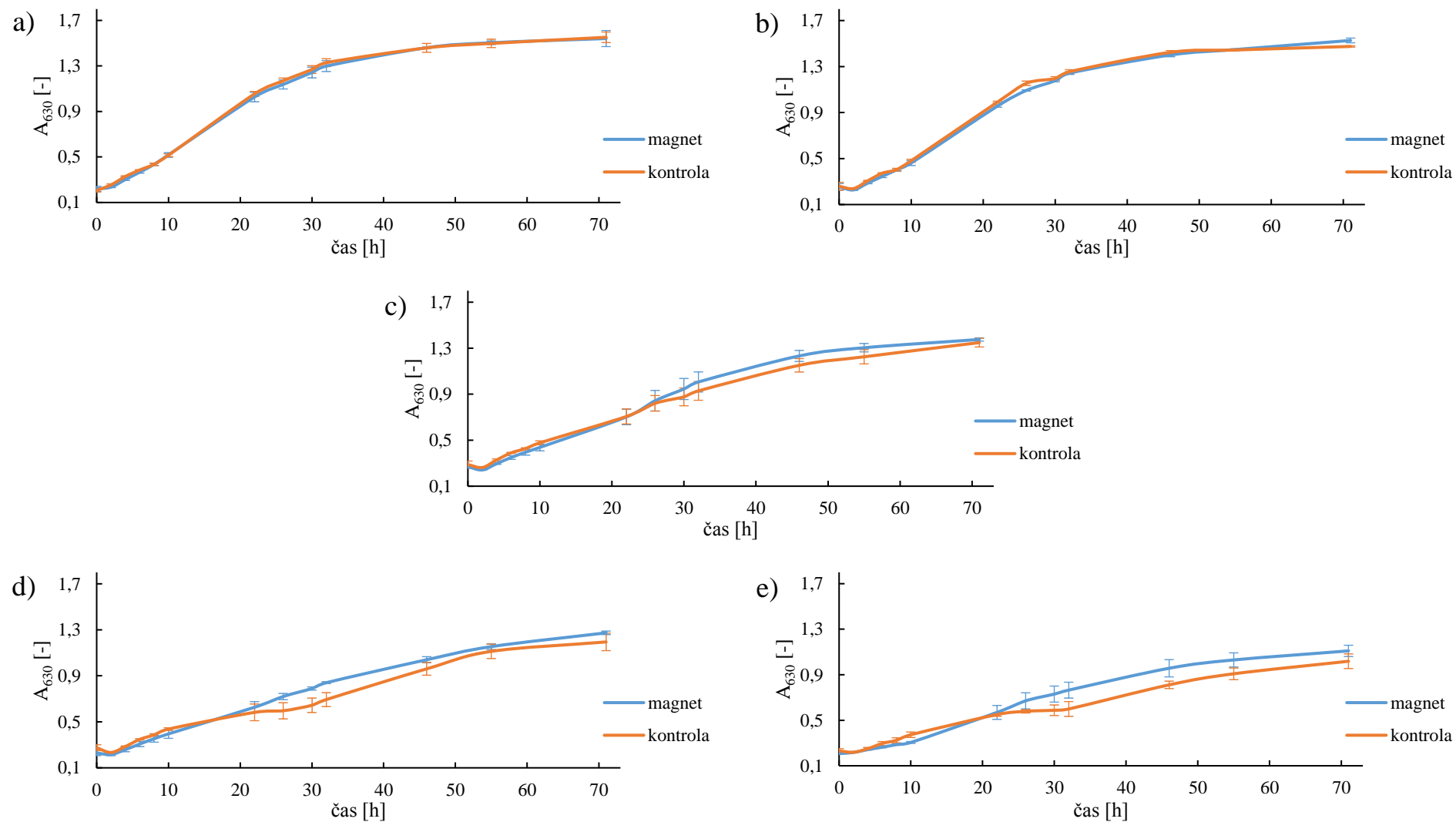
Vliv osmotického stresu na buňky bakterií *Cupriavidus necator* byl již dříve popsán i v rámci závěrečných prací na této fakultě (např. práce Ing. Miluše Miléřové *Studium odolnosti bakterií vůči vybraným stresovým faktorům* [53]). Proto bylo hypertonické prostředí studováno jen jako součást společného stresového působení s magnetickým polem. Sledován byl vliv na růst bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ pomocí stanovení růstových křivek znázorňujících závislost absorbance při 630 nm na čase pro koncentrace soli 0; 5; 10; 15 a 20 g/l. Pro stanovení hodnot absorbance byl použit přístroj ELISA reader BioTek ELx808 (BioTek). Vliv kultivace v poli permanentního magnetu pro *C. necator* H16 znázorňuje obrázek 13, vliv kultivace v magnetickém poli vytvářeného elektromagnetem pro *C. necator* H16 obrázek 14 a pro *C. necator* PHB⁻⁴ obrázek 15.

Při porovnání pouze vlivu osmotického stresu je možné pozorovat zpomalení růstu obou bakterií se zvyšující se koncentrací soli. Při použití permanentního magnetu nedocházelo k výraznému ovlivnění růstu *C. necator* H16, pouze u nejvyšších koncentrací 15 a 20 g/l lze pozorovat mírnou podporu růstu působením magnetického pole (viz obrázek 13d, e).

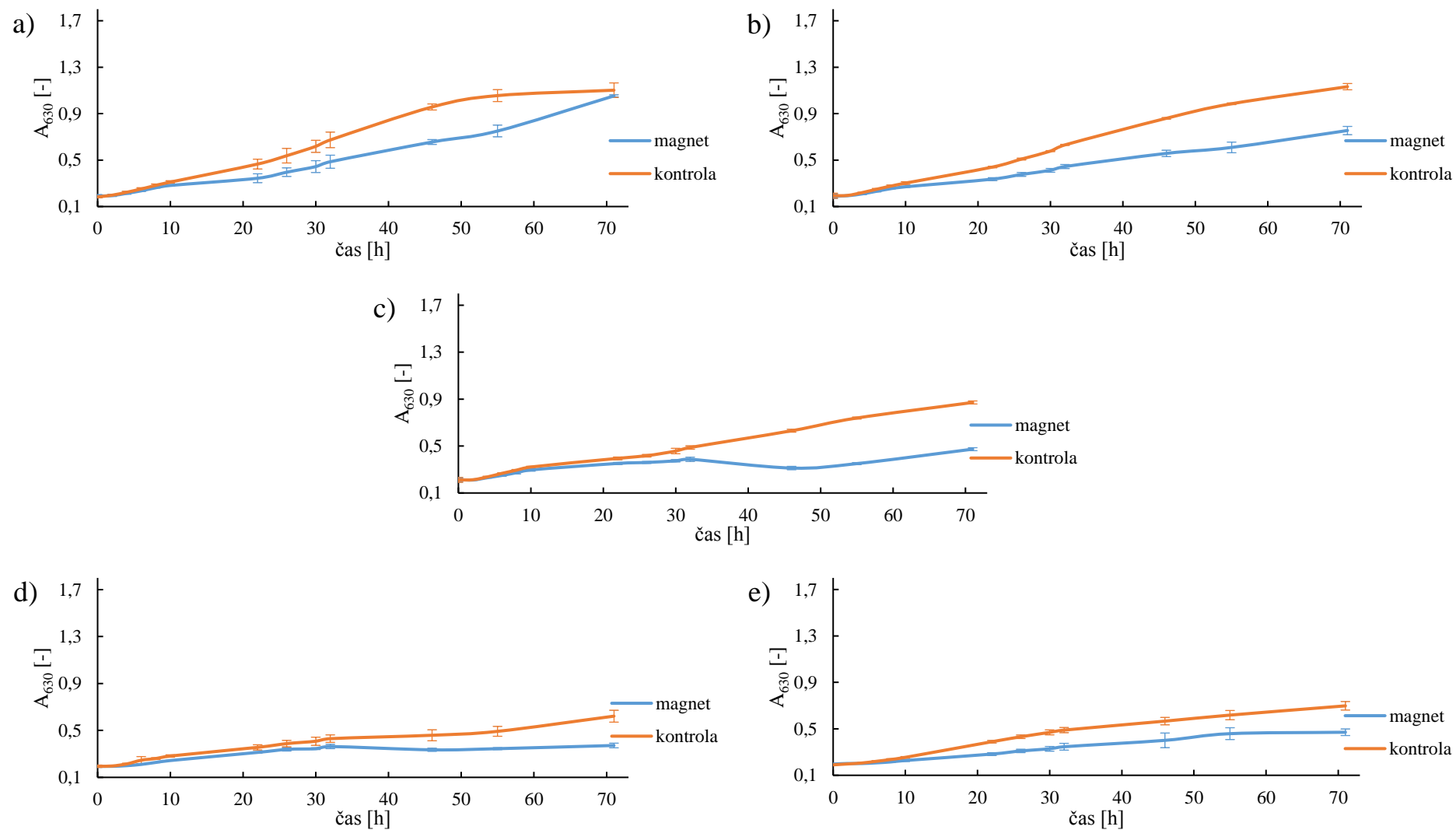
U bakterie *C. necator* H16 kultivované za použití elektromagnetu docházelo k umocnění vlivu osmotického stresu na bakteriální buňky pomocí magnetického pole. Největší rozdíl v inhibici růstu lze pozorovat u nižších koncentrací 5 a 10 g/l NaCl (viz obrázek 14b, c), vyšší koncentrace zpomalovaly růst natolik, že ani u kontrolních vorků kultivovaných mimo magnetické pole téměř nebyl zaznamenán růst kultur (viz obrázek 14d, e). Tento trend je možné vidět i u křivek sestavených pro bakterii *C. necator* PHB⁻⁴. V porovnání s *C. necator* H16 byl ale obsah biomasy v koncentracích 15 a 20 g/l ještě nižší (viz obrázek 15d, e).

Minimální vliv magnetického pole permanentního magnetu je možno vysvětlovat nízkou hodnotou magnetické indukce. Při nižších koncentracích solí se bakteriální buňky mohly jednodušeji adaptovat na slabě stresové prostředí. Při porovnání růstových křivek uvedených v předchozí kapitole (obrázek 11) a těch, které byly naměřeny v průběhu tohoto experimentu bez přídavku NaCl, je minimální vliv na růst možno vysvětlit tím, že pole vytvářené permanentním magnetem bylo poměrně slabé. Dále mohlo dojít k záměně pólů magnetu při umístění magnetu pod destičku na temperované třepačce a opačný magnetický pól nemusel bakteriální buňky ovlivňovat stejným způsobem.

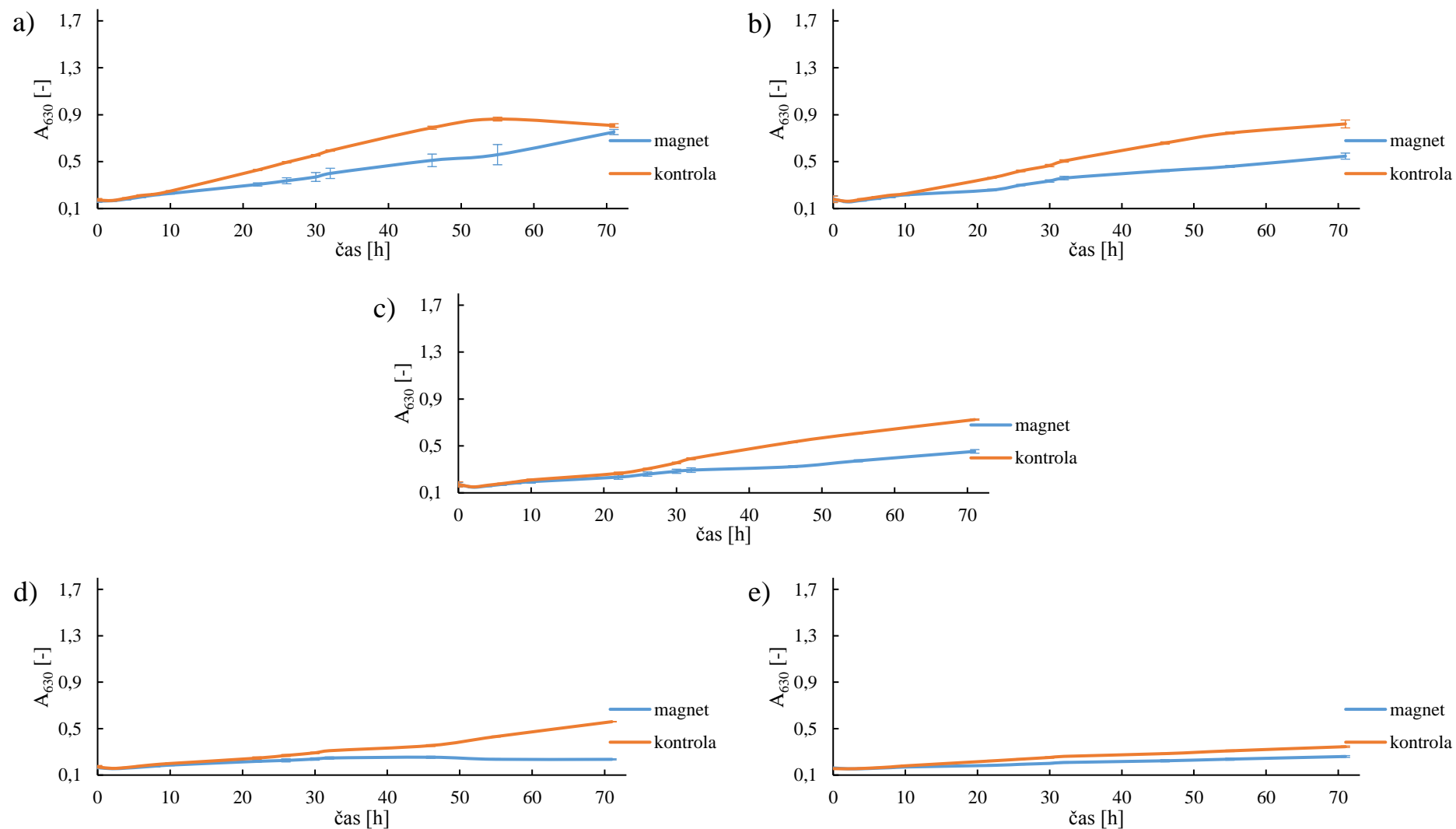
Jak bylo již zmíněno v kapitole 2.2.3 a 2.3.2 osmotický stres i magnetické pole narušují buněčné membrány i transport iontů. Umístěním do prostředí s vyšší koncentrací Na⁺ se zvyšuje i intracelulární koncentrace tohoto iontu. Když byly bakterie vystaveny také magnetickému poli, mohlo dojít k poškození transportu Na⁺ z buňky a tím k umocnění působení hypertonického prostředí. Nižší obsah biomasy u *C. necator* PHB⁻⁴, kmene neprodukujícího PHA, lze pak vysvětlit protektivními účinky těchto polymerů. Obsah PHA v buňkách vystavených poli permanentního magnetu a osmotického stresu byl dále studován pomocí analýzy FT-IR (viz kapitola 4.1.3).



Obrázek 13: Růstové křivky pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 v osmotickém stresu za použití permanentního magnetu a) koncentrace NaCl 0 g/l, b) koncentrace NaCl 5 g/l, c) koncentrace NaCl 10 g/l, d) koncentrace NaCl 15 g/l, e) koncentrace NaCl 20 g/l



Obrázek 14: Růstové křivky pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 v osmotickém stresu za použití elektromagnetu a) koncentrace NaCl 0 g/l, b) koncentrace NaCl 5 g/l, c) koncentrace NaCl 10 g/l, d) koncentrace NaCl 15 g/l, e) koncentrace NaCl 20 g/l



Obrázek 15: Růstové křivky pro kultivaci bakterie *C. necator* PHB⁻⁴ v osmotickém stresu za použití elektromagnetu a) koncentrace NaCl 0 g/l, b) koncentrace NaCl 5 g/l, c) koncentrace NaCl 10 g/l, d) koncentrace NaCl 15 g/l, e) koncentrace NaCl 20 g/l

4.1.3 Stanovení PHA v bakteriálních buňkách vystavených magnetickému poli

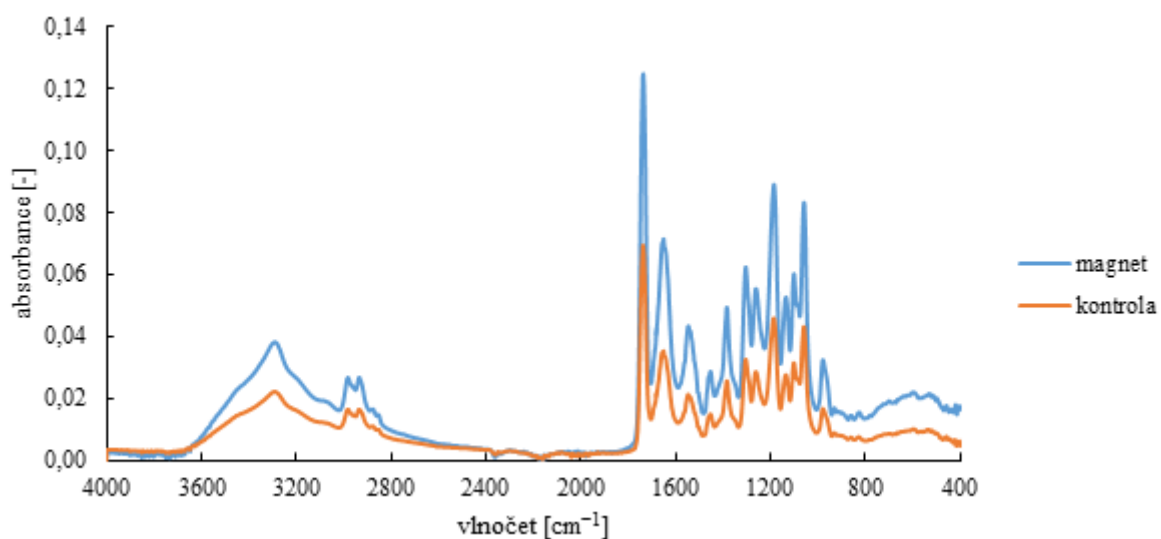
Pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací byl zkoumán obsah polyhydroxyalkanoátů v bakteriálních buňkách. Tato metoda byla vybrána místo plynové chromatografie z důvodu malého množství biomasy získaného kultivací v mikrotitračních destičkách. Dalšími výhodami infračerveného spektroskopu Nicolet iS50 ATR (ThermoScientific) oproti použití plynové chromatografie je rychlost a jednoduchost provedení jednotlivých analýz. Infračervená spektra byla sestrojena jako závislost absorpance na vlnětu a stanovena pro oblast $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Obsah PHB je pak popisován pásem 1734 cm^{-1} , další výrazný pás 3300 cm^{-1} pak poskytuje informaci o množství vody ve vzorku. Obsah polyhydroxyalkanoátů v buňkách bakterie *Cupriavidus necator* H16 byl sledován při kultivaci v minerálním médiu za použití permanentního magnetu, při kultivaci v minerálním médiu za použití elektromagnetu, při kultivaci v médiu Nutrient Broth za použití elektromagnetu a při společném působení osmotického stresu a pole permanentního magnetu.

Porovnáním infračervených spekter kultur kultivovaných v minerálním médiu za použití pevného magnetu a kontrolních vzorků (viz obrázek 16) bylo zjištěno, že v oblasti 1734 cm^{-1} je pro vzorek z magnetu pík vyšší než u bakterie kultivované bez stresového působení. Porovnáním s výsledky stanovení růstových křivek *C. necator* H16 v minerálním médiu (viz obrázek 11a) je pak možné usuzovat, že bakterie vystavené poli permanentního magnetu využívaly energii a uhlík spíše do syntézy PHA než do růstu. Podobnou závislost lze pozorovat i u vzorku z elektromagnetu při kultivaci v minerálním médiu (viz obrázek 17a). Oproti pevnému magnetu, je ale rozdíl mezi kontrolním vzorkem a tím, který byl vystaven magnetickému poli, vyšší.

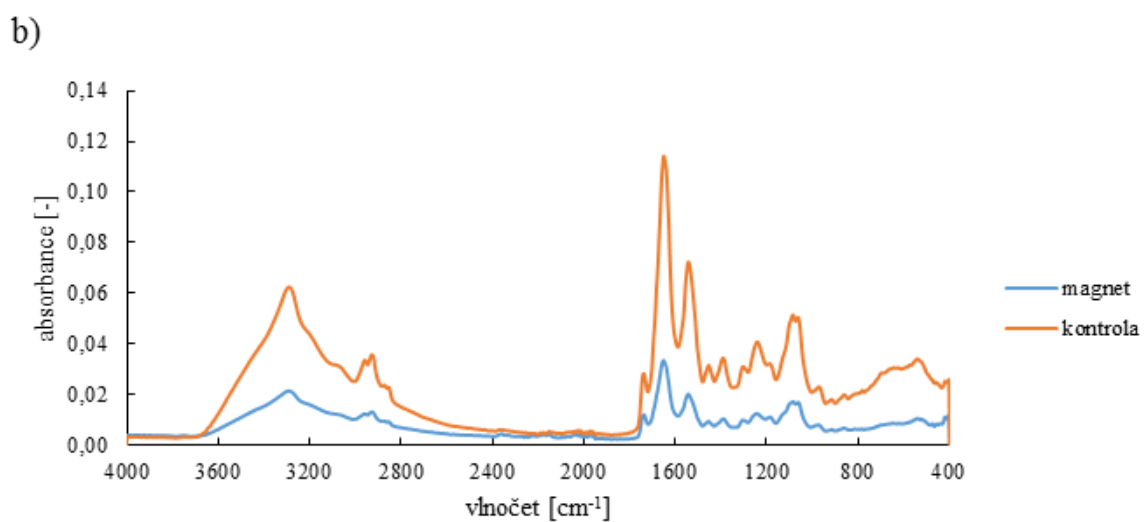
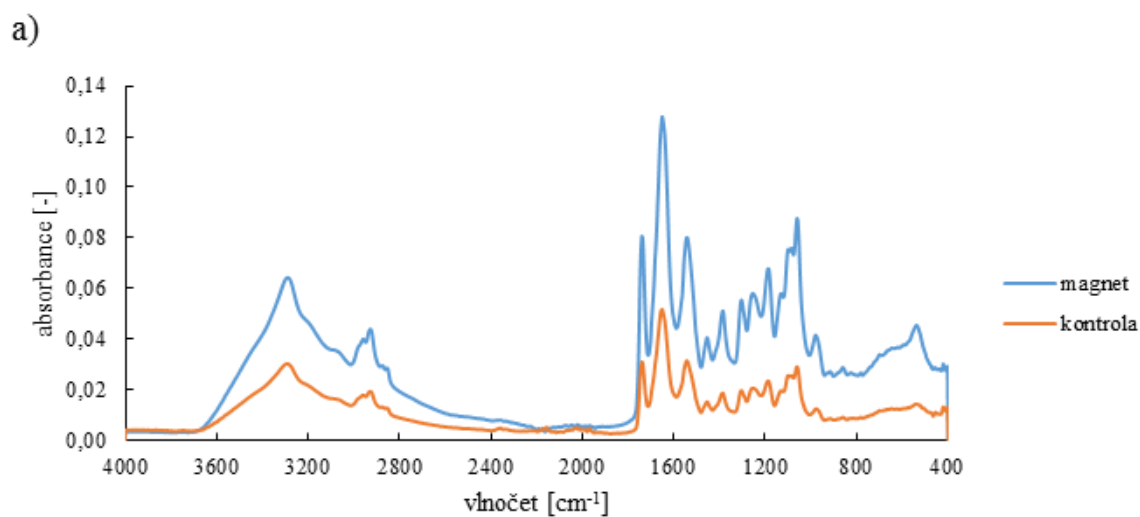
Při studiu vlivu různých kultivačních médií na produkci PHA bylo zjištěno, že zatímco magnetické pole a minerální médium tvorbu PHA podporuje, spektrum kultury v médiu Nutrient Broth mělo pík při 1734 cm^{-1} výrazně nižší (viz obrázek 17b). Projevoval se zde i odlišný vliv magnetického pole. Při kultivaci v poli elektromagnetu obsahovaly buňky bakterií nižší množství PHA než u kontrolního vzorku.

Spektra bakteriálních kultur vystavených jak magnetickému poli, tak osmotickému stresu obsahovala vyšší pík v oblasti 1734 cm^{-1} než spektra kontrolních vzorků, na které působil pouze osmotický stres. Se zvyšující se koncentrací soli v médiu docházelo ale i ke změně v obsahu polyhydroxyalkanoátů. Ve vzorcích vystavených magnetickému poli s přídatkem 5 a 10 g/l NaCl (viz obrázek 18b, c) se pík charakterizující obsah PHA snižoval, s koncentrací 15 a 20 g/l (viz obrázek 18d, e) ale množství PHA ve vzorku opět rostlo. U kontrolních kultur lze pozorovat také změny v obsahu PHA s rostoucí koncentrací soli. Nicméně na rozdíl od vzorků z magnetického pole se obsah polyhydroxyalkanoátů pouze snižoval. U vzorku s koncentrací soli 20 g/l je proto možno vidět nejvýraznější rozdíl mezi množství polyhydroxyalkanoátů v kontrolním vzorku a tomu, co byl vystaven magnetickému působení.

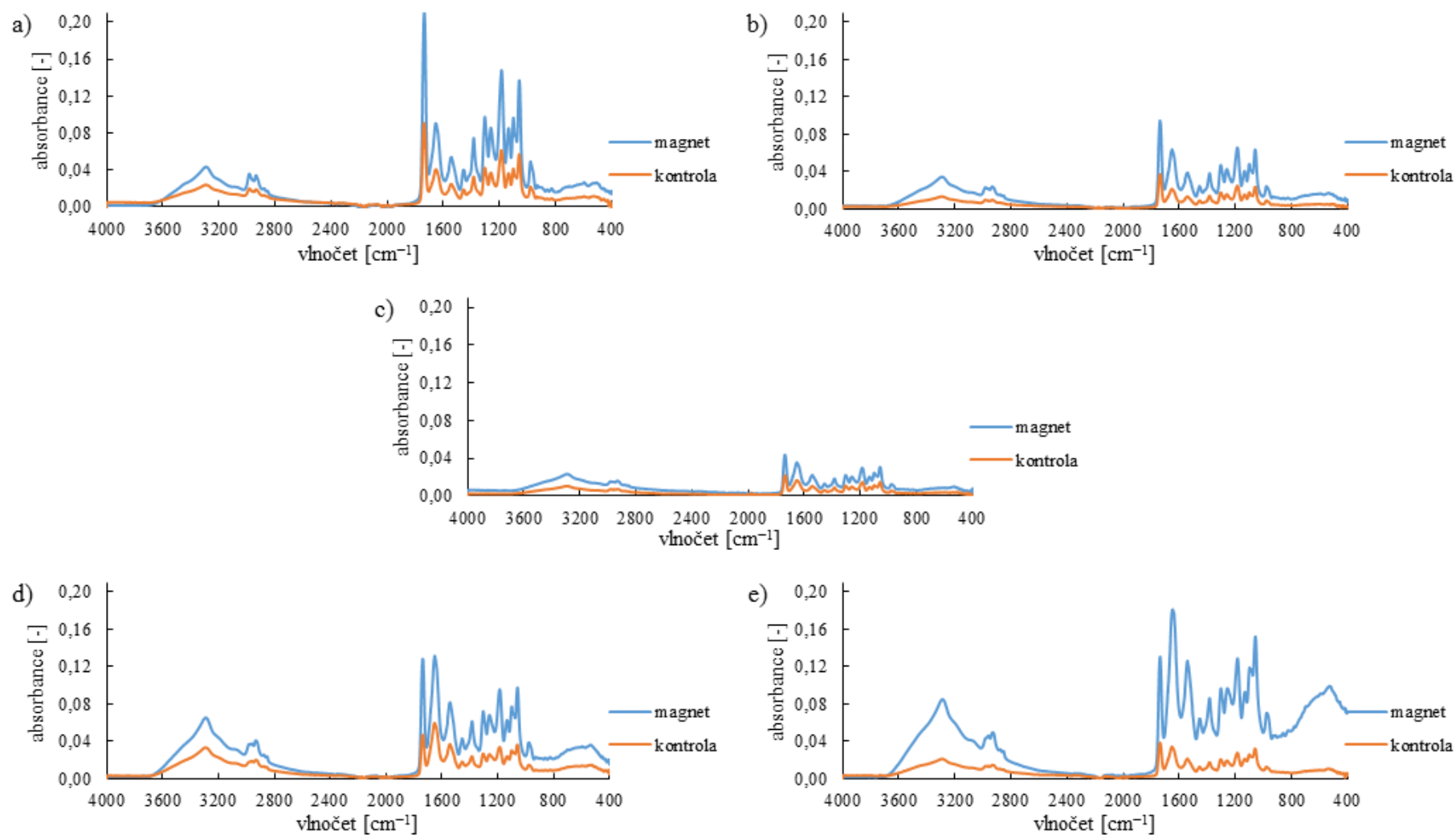
Obecně lze říci, že magnetické pole společně s kultivací v minerálním médiu pravděpodobně podporuje tvorbu polyhydroxyalkanoátů v bakteriálních buňkách, zatímco Nutrient Broth a magnetické pole produkci snižuje. Konkrétní příčina tohoto působení ovšem nebyla zatím dostatečně popsána.



Obrázek 16: FT-IR spektrum pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 v minerálním médiu za použití permanentního magnetu



Obrázek 17: FT-IR spektrum pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 za použití elektromagnetu
a) v minerálním médiu, b) v Nutrient Broth



Obrázek 18: FT-IR spektrum pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 v osmotickém stresu za použití permanentního magnetu a) koncentrace NaCl 0 g/l, b) koncentrace NaCl 5 g/l, c) koncentrace NaCl 10 g/l, d) koncentrace NaCl 15 g/l, e) koncentrace NaCl 20 g/l

4.1.4 Charakterizace morfologie bakteriálních buněk

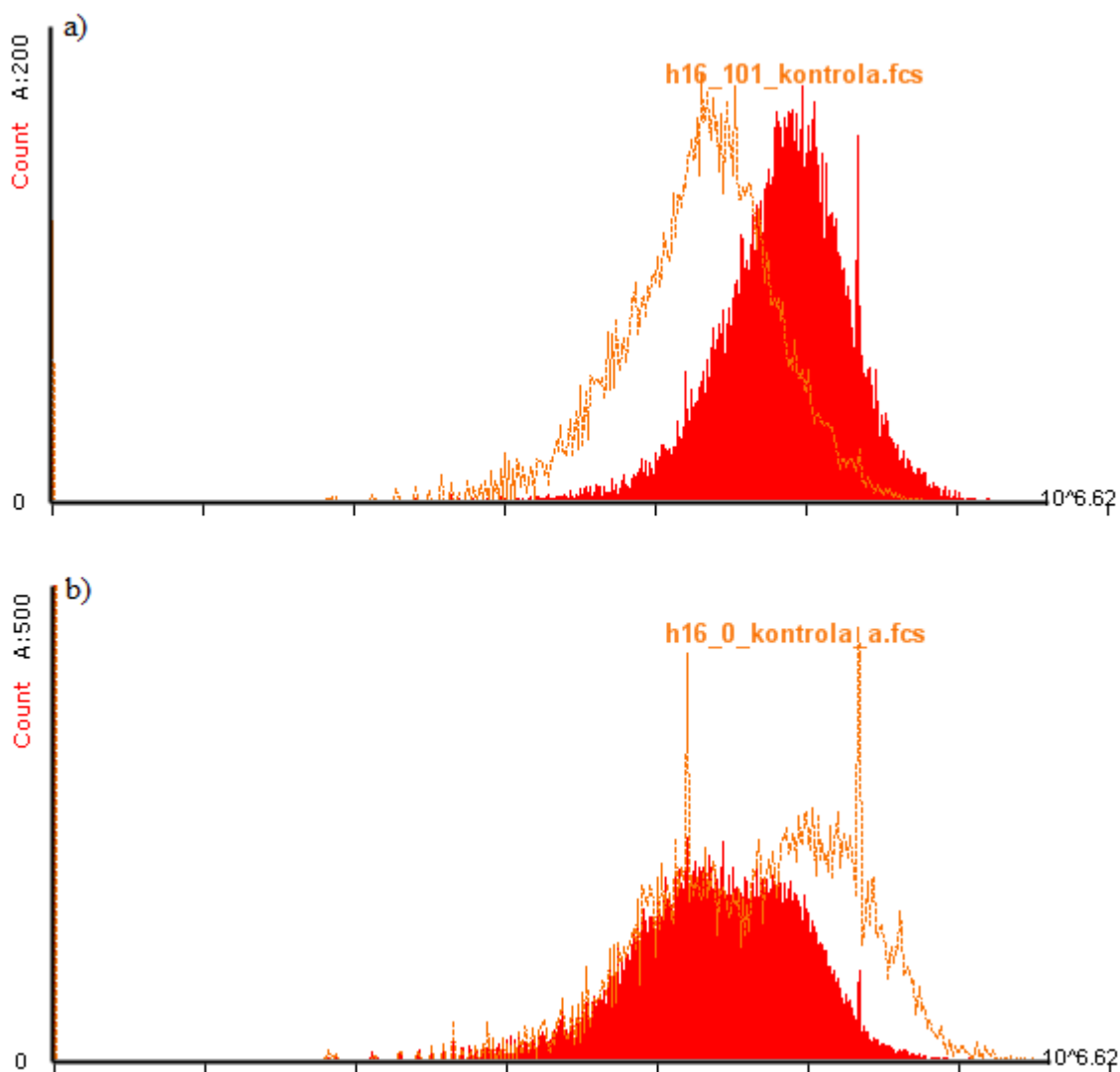
Morfologie bakteriálních buněk byla studována pomocí analýz na úrovni jedné buňky a to konkrétně průtokovou cytometrií s použitím nilské červeni jako fluorescenční sondy a mikroskopie s fluorescenční sondou BODIPY 439/503. Obě tato barviva jsou lipofilního charakteru. Nilská červeň je používána nejen pro barvení granulí PHA ale váže se i na lipidové membrány či proteiny, BODIPY 439/503 se pak využívá převážně při barvení granulí PHA. Pro usnadnění pronikání barviva do buňky byly vzorky fixovány roztokem ethanolu. Pomocí průtokového cytometru Apogee A50 (Apogee Flow Systems) byl studován rozdíl v intenzitě fluorescence kultur z magnetického pole a kontrolních. Tabulka 1 uvádí medián naměřených hodnot pro 2 kultivace bakterie *C. necator* H16 v magnetickém poli vytvářeném permanentním magnetem.

Tabulka 1: Intenzita fluorescence pro kultivace bakterie *C. necator* H16 za použití permanentního magnetu a barvení nilskou červení

kultura	intenzita fluorescence		
	1. kultivace	2. kultivace	
magnet	81663±608	15105±1123	92731±11676
kontrola	24097±897	13572	138551

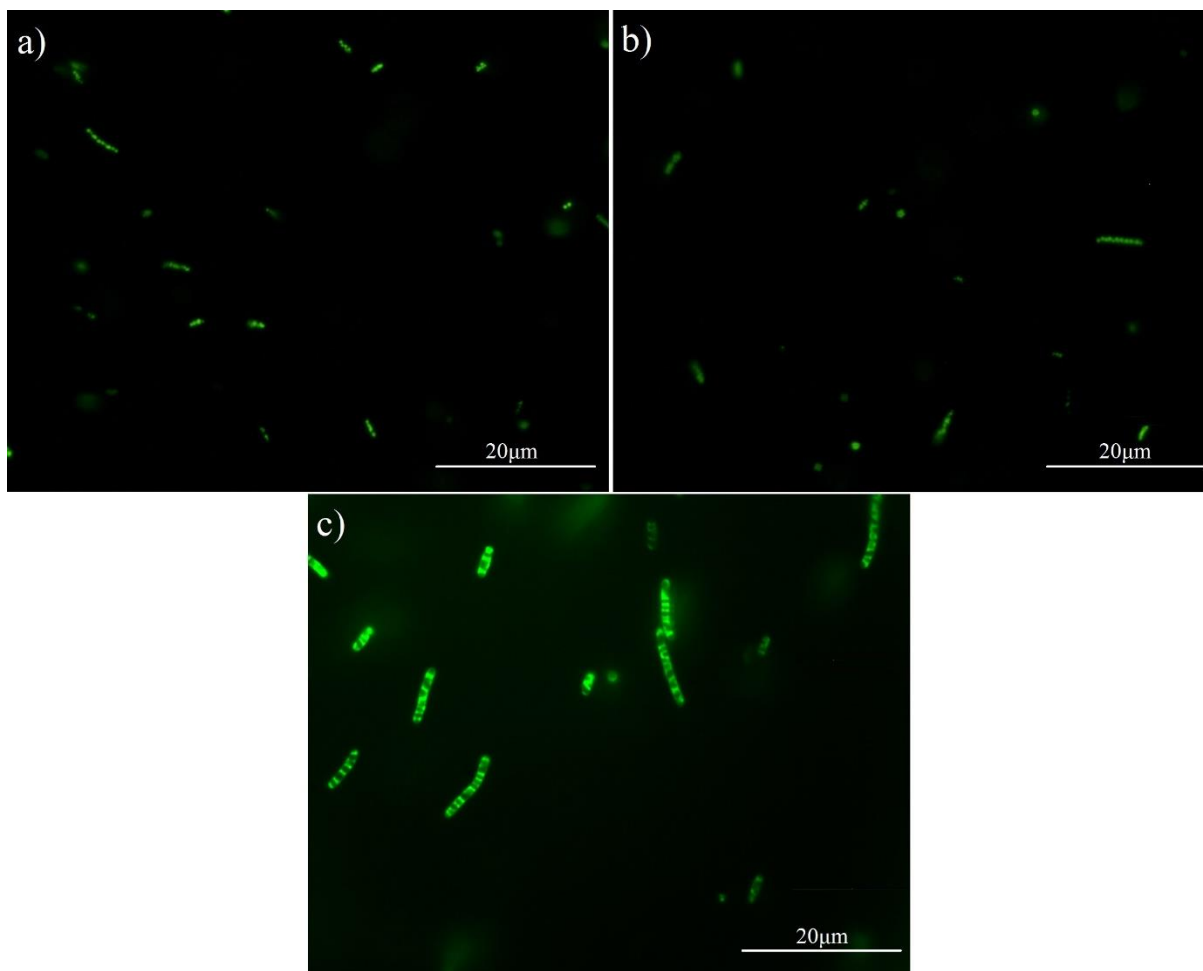
U první kultivace se ve vzorcích nacházela pouze jedna populace buněk. Z hodnot intenzity fluorescence vyplývá, že bakterie kultivované v magnetickém poli obsahovaly ve svých buňkách vyšší množství PHA než bakterie kultivované za optimálních podmínek. Tento výsledek odpovídá také stanoveným spektrům FT-IR (viz obrázek 16). Analýza druhé kultivace ale zjistila v obou vzorcích dvě subpopulace buněk s odlišnou intenzitou fluorescence. Vzorek kultivovaný v magnetickém poli obsahoval více buněk o vyšší intenzitě fluorescence a tedy vyšším obsahu PHA stejně jako kontrolní vzorek kultivovaný za optimálních podmínek. Ten byl proměřen při druhé kultivaci pouze jednou z důvodu jeho malého objemu, který by obsahoval dostatečné množství buněk pro danou analýzu. Rozdíl intenzity fluorescence mezi subpopulacemi v tomto vzorku byl ale vyšší než u bakterií kultivovaných v magnetickém poli. Obrázek 19 uvádí vybrané histogramy první a druhé kultivace s porovnáním vzorků z magnetického pole a kontrolních kultur.

Rozdílné výsledky lze vysvětlovat podobně jako v kapitole 4.1.2 a to možnostmi, že byly při druhé kultivaci vystaveny bakterie opačnému magnetickému pólu a vliv obou pólů na buňky nemusel být stejný. Případně mohl rozdíl ve výsledcích být způsoben kontaminací druhého měření, což by vysvětlovalo dva typy populací.



Obrázek 19: Porovnání histogramů dvou měření pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 v minerálním médiu za použití permanentního magnetu

Dále byl obsah polyhydroxyalkanoátů v buňkách bakterie *Cupriavidus necator* H16 při kultivaci za použití permanentního magnetu sledován pomocí optického mikroskopu Eclipse E200 (Nikon) s přidavkem fluorescenčního barviva BODIPY, viz obrázek 20. Mezi vzorky kultivovanými v magnetickém poli a kontrolními nebyl ovšem pozorován výrazný rozdíl ani ve velikosti buněk, ani jejich fluorescenci. Srovnáním s buňkami kultivovanými ve 100 ml média v Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml bylo ale zjištěno, že buňky z mikrotitračních destiček jsou výrazně menší. Charakterizace těchto buněk pomocí mikroskopu tedy není vhodnou metodou. Při kultivaci v mikrotitračních destičkách jsou bakterie více limitovány kyslíkem. I při umístění na třepačky nedochází k tak dobrému rozpouštění kyslíku jako při kultivaci ve větších objemech a pravděpodobně proto bakteriální buňky nedorůstají stejné velikosti.



Obrázek 20: Porovnání snímků z mikroskopu pro kultivaci bakterie *C. necator* H16 v minerálním médiu v uspořádání a) mikrotitrační destička permanentní magnet, b) mikrotitrační destička bez stresového působení, c) 250ml Erlenmeyerova baňka bez stresového působení

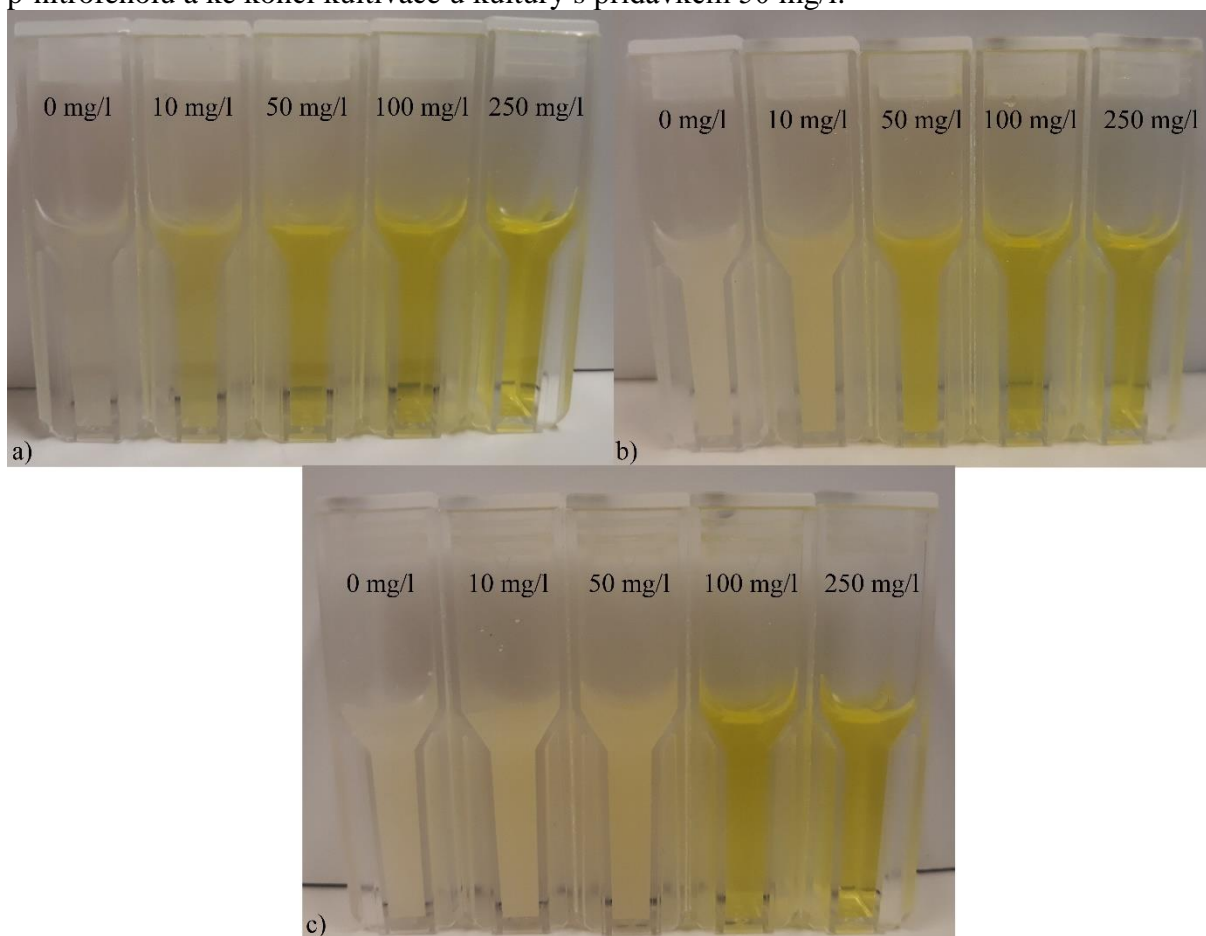
4.2 Vliv organických polutantů

4.2.1 Vliv organických polutantů na dělení buněk

Pomocí stanovení růstových křivek pro bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byl sledován vliv aromatických sloučenin na mikrobiální buňky. Křivky byly sestaveny jako závislost absorpance při vlnové délce 630 nm na čase pro koncentrace benzenu či p-nitrofenolu v roztoku média 0; 10; 50; 100 a 250 mg/l, viz obrázek 22.

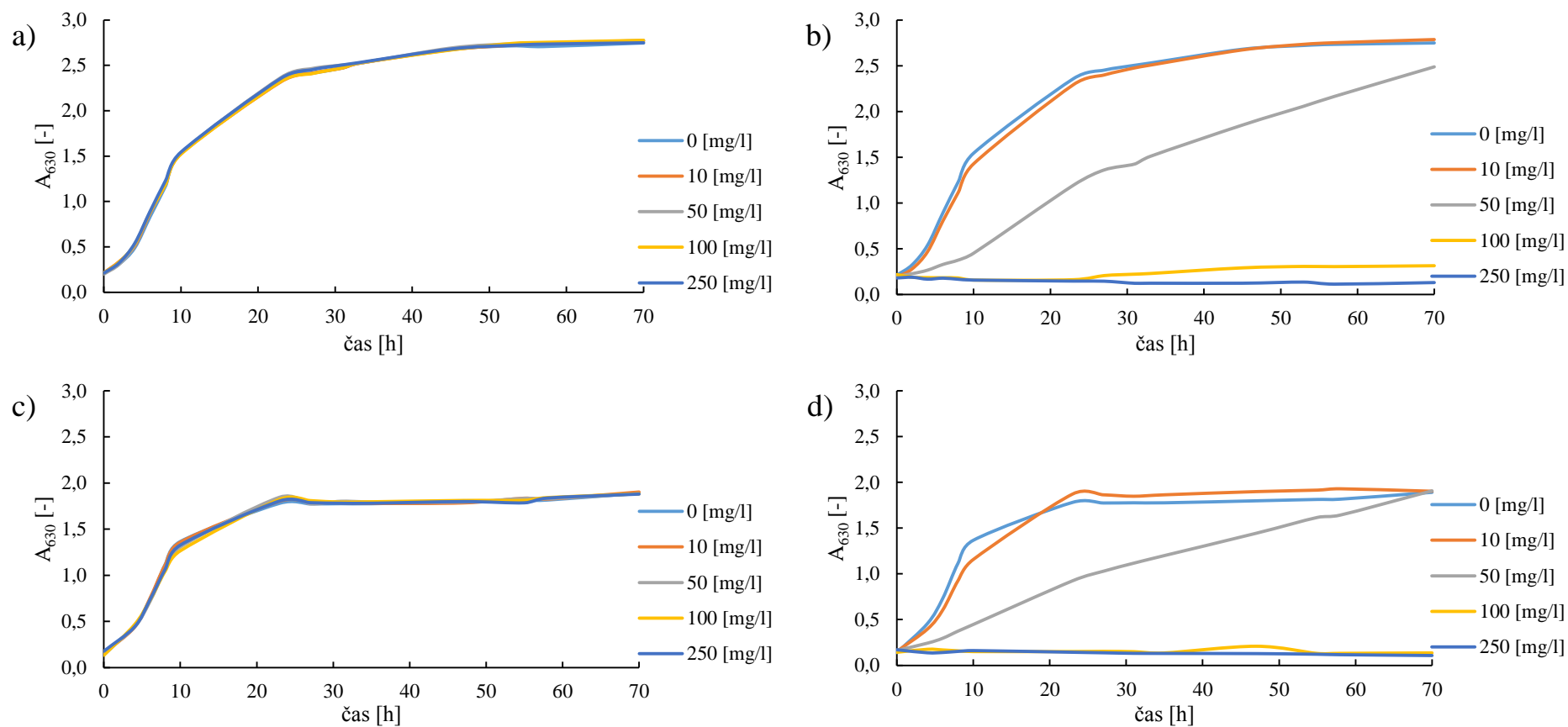
Při kultivaci *Cupriavidus necator* H16 i *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ v médiu s přídatkem benzenu nedocházelo ani se zvyšující se koncentrací organické látky k žádnému ovlivňování růstu (viz obrázek 22a, c). Výraznější změny je ale možno sledovat u p-nitrofenolu (viz obrázek 22b, d). Ten v koncentraci 10 mg/l výrazně růst ani jedné bakterie neovlivňoval, u 50 mg/l ale lze již sledovat inhibici růstu. V počáteční fázi kultivace byl růst bakterií výrazně inhibován a konci kultivace docházelo ke zvyšování hodnot absorpance, které u *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ i vyrovnaly hodnoty stanovené pro nižší koncentrace. Obsah p-nitrofenolu 100 a 250 mg/l pak inhiboval růst buněk natolik, že není možné pozorovat téměř žádné zvýšení turbidity vzorků. Rozdíl mezi kultivacemi s odlišnými koncentracemi p-nitrofenolu bylo možno pozorovat i vizuálně, pro bakterii *C. necator* H16 znázorňuje obrázek 21. S rostoucí dobou kultivace docházelo k zvyšování zákalu nejen u vzorku

kontrolní kultury bez přídavku aromatické látky ale výrazně i u kultury s přídavkem 10 mg/l p-nitrofenolu a ke konci kultivace u kultury s přídavkem 50 mg/l.



Obrázek 21: Průběh kultivace bakterie *C. necator* H16 v p-nitrofenolu v čase a) 0 hodin, b) 24 hodin, c) 72 hodin

U bakterie *C. necator* JMP134 bylo zjištěno, že dokáže benzen metabolizovat [54]. Je tedy pravděpodobné vzhledem k stanoveným růstovým křivkám pro *C. necator* H16 i *C. necator* PHB⁻⁴, že i tyto bakterie mohou tuto látku v použitých koncentracích odbourávat. Jak bylo již zmíněno v kapitole 2.2.5 bakterie *Cupriavidus necator* JMP134 je schopna metabolizovat i m-nitrofenol. Podle stanovených růstových křivek je ale možno říci, že p-nitrofenol má negativní efekt na růst *C. necator* H16 i *C. necator* PHB⁻⁴ a jeho konkrétnější vliv na buňky bude diskutován v následujících kapitolách.



Obrázek 22: Růstové křivky pro kultivaci bakterií v prostředí organických polutantů pro a) *C. necator* H16 benzen, b) *C. necator* H16 p-nitrofenol, c) *C. necator* PHB⁻⁴ benzen, d) *C. necator* PHB⁻⁴ p-nitrofenol

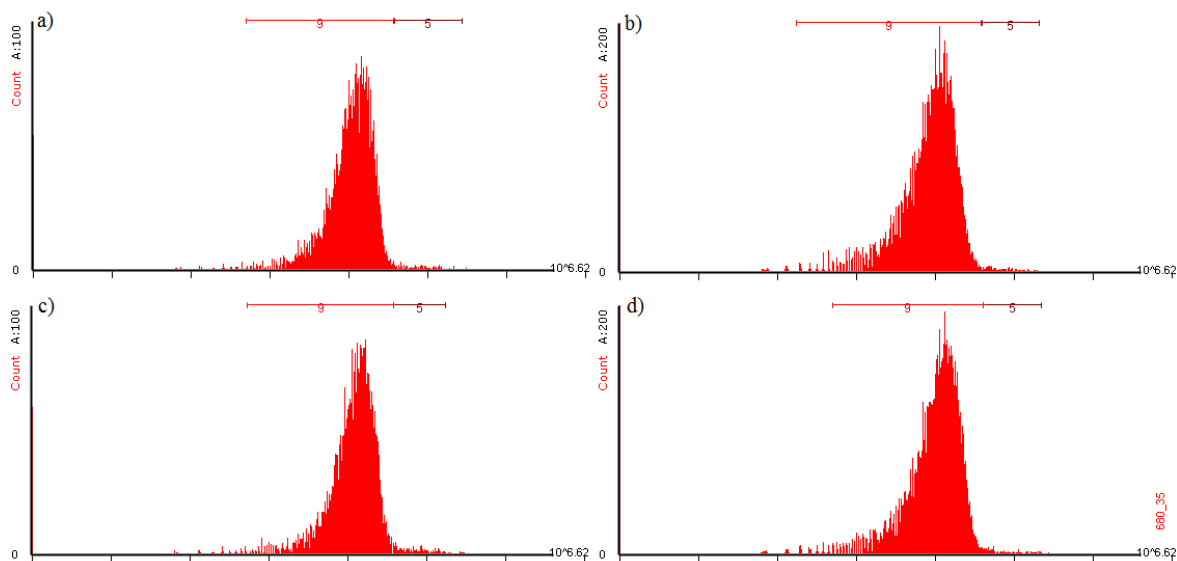
4.2.2 Viabilita buněk stanovená pomocí průtokového cytometru

Akutní cytotoxicita p-nitrofenolu byla stanovována pro bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ pomocí průtokové cytometrie. Pro značení buněk bylo použito interkalační barvivo propidium jodid, které prochází do mrtvých buněk a váže se na DNA. Analýzou na průtokovém cytometru Apogee A50 (Apogee Flow Systems) byly sledovány 2 koncentrace p-nitrofenolu, 250 a 1000 mg/l. Závislost množství živých buněk na čase expozice bakteriálních buněk různým koncentracím p-nitrofenolu uvádí tabulka 2.

Tabulka 2: Stanovení akutní cytotoxicity p-nitrofenolu

c [mg/l]	t [min]	živé buňky [%]	
		H16	PHB ⁻⁴
250	30	98,01±0,56	99,11±0,23
	60	98,43±0,39	99,44±0,03
	90	98,46±0,13	99,26±0,26
	120	98,53±0,28	98,97±0,11
1000	30	98,29±0,14	98,83±0,30
	60	98,36±0,12	98,72±0,09
	90	97,81±0,24	98,77±0,14
	120	97,95±0,28	98,93±0,32

Pro obě koncentrace p-nitrofenolu nebylo pozorováno výrazné snížení počtu živých buněk se zvyšující se dobou působení této organické látky. Obrázek 23 uvádí vybrané histogramy pro obě bakterie i koncentrace p-nitrofenolu. Na těchto histogramech lze pozorovat, že vzorky obsahují sice 2 typy buněk, naprostou většinu ale tvoří pík s nižší intenzitou fluorescence, který odpovídá množství viabilních buněk. Z toho, že se množství živých buněk s časem ani koncentrací neměnilo, lze usuzovat, že p-nitrofenol není pro *Cupriavidus necator* H16 ani *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ akutně cytotoxický, ale působí jako inhibitor růstu.



Obrázek 23: Ukázkové histogramy pro kultivaci bakterií s přidavkem p-nitrofenolu pro
a) *C. necator* H16 250 mg/l, b) *C. necator* PHB⁻⁴ 250 mg/l, c) *C. necator* H16 1000 mg/l,
d) *C. necator* PHB⁻⁴ 1000 mg/l

4.2.3 Vliv p-nitrofenolu na produkci PHA

Pomocí gravimetrie a plynové chromatografie bylo stanoveno množství suché biomasy v 10 ml suspence bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a pro *Cupriavidus necator* H16 i procentuální obsah P(3HB). Příprava vzorků na plynovou chromatografii je sice náročná ve srovnání s analýzou pomocí FT-IR, ale pomocí této metody je možno získat přesné hodnoty obsahu PHA v buňkách. Pro stanovení obsahu PHA v bakteriálních buňkách byla sestavena kalibrační křivka ředěním zásobního roztoku způsobem uvedeným v kapitole 3.2.8.1 a následnou analýzou pomocí plynového chromatografu Trace 1300 (Thermo Scientific) s plamenovým ionizačním detektorem. Ze závislosti plochy píku na koncentraci P(3HB) byla určena rovnice kalibrační křivky:

$$y = 0,0957508x \quad (2)$$

Vzhledem k stanoveným růstovým křivkám pro bakterie kultivované v přítomnosti benzenu a p-nitrofenolu v kapitole 4.2 byly vybrány koncentrace p-nitrofenolu 0; 10 a 50 mg/l, u kterých docházelo k ovlivňování růstu, ale stále byla produkována biomasa. Výsledky uvádí tabulka 3.

Tabulka 3: Stanovení obsahu biomasy a PHB v buňkách

c p-NF [mg/l]	H16		PHB ⁻⁴
	m biomasa [g/l]	w P(3HB) [%]	m biomasa [g/l]
0	9,28±0,04	86,29±1,55	1,16±0,17
10	8,64±0,09	84,28±4,12	1,16±0,11
50	4,00±0,07	67,91±2,48	1,14±0,24

U bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ nedocházelo ke snižování biomasy s rostoucí koncentrací p-nitrofenolu. To potvrzuje stanovené růstové křivky z kapitoly 4.2.1, kdy i přes počáteční inhibici růstu při koncentraci 50 mg/l došlo ke konci kultivace k vyrovnání optické hustoty na hodnoty vzorků s 0 a 10 mg/l této organické látky. Vzorky *C. necator* H16 ale obsahovaly nižší množství sušiny se zvyšující se koncentrací p-nitrofenolu. Snižování hmotnosti biomasy bylo spojeno také se snížením obsahu polyhydroxyalkanoátů v buňkách. Stanovené hodnoty také podporují výsledky růstových křivek *Cupriavidus necator* H16 z kapitoly 4.2.1. Růst této bakterie byl inhibován přítomností 50 mg/l p-nitrofenolu v médiu. Ke konci kultivace došlo sice ke zvýšení absorbance, ale hodnoty vzorků 0 a 10 mg/l nebyly vyrovnány. P-nitrofenol tedy nepůsobí pouze jako inhibitor růstu, ale snižuje také tvorbu PHA v bakteriálních buňkách.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo stanovit vliv magnetického pole a vybraných aromatických látek na růst a fyziologii bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Pro studium vlivu magnetického pole byla použita kultivace v poli vytvářeném permanentním magnetem i elektromagnetem a z aromatických látek byl vybrán benzen a p-nitrofenol. Konkrétně byl sledován růst bakteriálních buněk a produkce polyhydroxyalkanoátů.

Růst obou výše zmíněných bakterií v magnetickém poli byl sledován stanovením růstových křivek, tedy závislosti absorpance vzorku kultury na čase. Společně s různými typy zdroje magnetického pole byl studován i vliv různých kultivačních médií, konkrétně minerální médium, které podporuje produkci PHA a Nutrient Broth, komplexní médium nepodporující tvorbu PHA. Při použití permanentního magnetu a minerálního média docházelo převážně k inhibici růstu buněk ve všech růstových fázích. Kultivace v Nutrient Broth a magnetickém poli ale inhibovala růst pouze v exponenciální fázi a ve stacionární bylo množství biomasy vyšší než v kontrolním vzorku kultury. Podobný trend byl pozorován i při kultivaci bakterií v elektromagnetu. Výrazný vliv možnosti akumulace polyhydroxyalkanoátů na růst bakteriálních buněk se neprojevoval.

Dále byl studován společný vliv magnetického pole a osmotického stresu na bakteriální buňky. Kultury kultivované v poli permanentního magnetu nebyly ale tímto stresovým faktorem téměř ovlivněny. Při použití elektromagnetu ale docházelo k výrazné inhibici bakteriálního růstu magnetickým polem u vzorků s nižšími koncentracemi soli v médiu. Vyšší koncentrace 15 a 20 g/l NaCl inhibovaly růst buněk natolik, že ani v kontrolních vzorcích kultivovaných mimo magnetické pole nebyl téměř pozorován žádný růst.

Obsah polyhydroxyalkanoátů v buňkách *C. necator* H16 byl sledován pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Ze stanovených spekter vyplývá, že v bakteriálních buňkách kultivovaných v minerálním médiu a vystavených poli permanentního magnetu i elektromagnetu bylo obsaženo vyšší množství PHA než v kontrolních kulturách. Při kultivaci na permanentním magnetu byl také sledován vliv osmotického stresu, kdy bylo zjištěno, že produkce PHA byla magnetickým polem podporována, ale měnila se v závislosti na koncentraci soli, nejnižší při 10 g/l NaCl. Pro elektromagnet byl pak sledován vliv různých médií, kdy bylo zjištěno, že zatímco minerální médium a magnetické pole produkci PHA podporují, komplexní médium Nutrient Broth a magnetické pole nevytváří pro akumulaci PHA vhodné podmínky.

Morfologie buněk *C. necator* H16 byla následně sledována pomocí analýz na úrovni jedné buňky, konkrétně průtokové cytometrie a mikroskopie s fluorescenční sondou. Hodnoty fluorescence buněk stanovených pomocí průtokového cytometru s použitím nilské červeně byly ale pro jednotlivé kultivace příliš odlišné pro určení konkrétního vlivu magnetického pole na tvar bakteriálních buněk. Sledováním buněk barvených fluorescenčním barvivem BODIPY pod mikroskopem bylo zjištěno, že buňky kultivované v mikrotitračních destičkách jsou příliš malé oproti těm, které jsou kultivované ve větším objemu média, pravděpodobně kvůli limitaci kyslíkem. Proto ani tato metoda tedy nebyla vhodná pro charakterizaci daných mikroorganismů.

Dále byl studován vliv přídavku benzenu a p-nitrofenolu do kultivačního média na růst buněk *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Bylo zjištěno, že benzen v koncentracích 10; 50; 100 ani 250 mg/l růst těchto bakterií neovlivňuje. U p-nitrofenolu byla ale sledována inhibice růstu již od 50 mg/l. Kromě stanovení růstových křivek bylo možné tento efekt pozorovat i vizuálně zvyšujícím se zákalem vzorků kultur pouze u koncentrací 0; 10 a 50 mg/l.

Konkrétní efekt p-nitrofenolu na buňky byl sledován pomocí průtokové cytometrie s použitím propidium jodidu jako fluorescenční sondy. Počet živých buněk ve vzorku kultur byl měřen po dobu 2 hodin a bylo zjištěno, že s prodlužujícím se působením p-nitrofenolu nedochází ke zvyšování počtu mrtvých buněk ve vzorku a koncentrace 250 a 1000 mg/l tedy nepůsobí akutně cytotoxicky ale jako inhibitor růstu.

Následně byl studován také vliv p-nitrofenolu na produkci biomasy bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Vybrány byly koncentrace 10 a 50 mg/l, kdy byl stále pozorován růst buněk. Opět byl potvrzen trend stanovený pomocí růstových křivek a to, že zatímco obsah biomasy *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ se působením koncentrací 10 a 50 mg/l p-nitrofenolu nemění, u *Cupriavidus necator* H16 je možno při koncentraci 50 mg/l p-nitrofenolu pozorovat snížení množství biomasy. Dále byl stanoven i vliv p-nitrofenolu na produkci polyhydroxyalkanoátů bakterií *Cupriavidus necator* H16 pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací této aromatické látky dochází nejen ke snižování hmotnosti sušiny vzorku, ale i ke snížení obsahu polyhydroxyalkanoátů v buňkách a to o více než 20%.

LITERATURA

- [1] CLARKE, Kim Gail. Microbiology. *Bioprocess Engineering* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 7-24 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1533/9781782421689.7. ISBN 9781782421672. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782421672500028>
- [2] WHITE, David, James DRUMMOND a Clay FUQUA. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2012. ISBN 9780195393040.
- [3] MURAT, D., M. BYRNE a A. KOMEILI. Cell Biology of Prokaryotic Organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010, **2**(10), a000422-a000422 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1101/cshperspect.a000422. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a000422>
- [4] COHEN, William W. How Cells Work. *A Computer Scientist's Guide to Cell Biology* [online]. Boston, MA: Springer US, 2007, s. 1-17 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1007/978-0-387-48278-1_1. ISBN 978-0-387-48275-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-48278-1_1
- [5] WIDŁAK, Wiesława. Cells and Viruses. WIDŁAK, Wiesława, ed. *Molecular Biology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, 2013, s. 1-13 [cit. 2019-02-26]. Lecture Notes in Computer Science. DOI: 10.1007/978-3-642-45361-8_1. ISBN 978-3-642-45360-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-45361-8_1
- [6] VELLAI, T. a G. VIDA. The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. 1999, **266**(1428), 1571-1577 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1098/rspb.1999.0817. ISSN 1471-2954. Dostupné z: <http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.1999.0817>
- [7] TEE, Kang Lan, James GRINHAM, Arona M. OTHUSITSE, Miriam GONZÁLEZ-VILLANUEVA, Abayomi O. JOHNSON a Tuck Seng WONG. An Efficient Transformation Method for the Bioplastic-Producing “Knallgas” Bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Biotechnology Journal* [online]. 2017, **12**(11) [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1002/biot.201700081. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201700081>
- [8] KUTRALAM-MUNIASAMY, Gurusamy a Fermín PERÉZ-GUEVARA. Genome characteristics dictate poly-R-(3)-hydroxyalkanoate production in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, **34**(6) [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1007/s11274-018-2460-5. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-018-2460-5>
- [9] RABERG, Matthias, Birgit VOIGT, Michael HECKER, Alexander STEINBÜCHEL a Marie-Joelle VIROLLE. A Closer Look on the Polyhydroxybutyrate- (PHB-) Negative Phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(5) [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1371/journal.pone.0095907. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095907>

- [10] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161-174 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774>
- [11] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* [online]. 2014, **8**(11), 791-808 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618X. Dostupné z: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005219&mi=c>
- [12] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, **8**(4), e265-e265 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1038/am.2016.48. ISSN 1884-4049. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/am201648>
- [13] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* [online]. 2016, **192**, 271-282 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [14] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology* [online]. 2001, **86**(2), 97-104 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00404-1. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600004041>
- [15] PRIYADARSHI, Siddharth, Anubha SHUKLA a Babasaheb Bhaskarrao BORSE. Polyhydroxyalkanoates: Role of Ralstonia eutropha. *International Journal of Biomedical and Advance Research* [online]. 2014, **5**(2), 68-76 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.7439/ijbar.v5i2.639. ISSN 2229-3809. Dostupné z: <http://ssjournals.com/index.php/ijbar/article/view/454>
- [16] HOFFMANN, Nils a Bernd H.A REHM. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in Pseudomonas putida and Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2004, **237**(1), 1-7 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09671.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09671.x>
- [17] LUSHCHAK, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2014, **224**, 164-175 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016. ISSN 00092797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279714003044>
- [18] KASHMIRI, Z. N. a S. A. MANKAR. Free radicals and oxidative stress in bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. 2014, **3**(9), 34-40 [cit. 2019-02-26]. ISSN 2319-7706. Dostupné z: <https://www.ijcmas.com/vol-3-9/Z.N.Kashmiri%20and%20S.A.Mankar.pdf>

- [19] LUSHCHAK, Volodymyr I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 2011, 153(2), 175-190 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1016/j.cbpc.2010.10.004. ISSN 15320456. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045610001754>
- [20] RASTOGI, Rajesh P., RICHA, Ashok KUMAR, Madhu B. TYAGI a Rajeshwar P. SINHA. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids* [online]. 2010, **2010**, 1-32 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.4061/2010/592980. ISSN 2090-021X. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jna/2010/592980/>
- [21] DAI, Tianhong, Mark S VRAHAS, Clinton K MURRAY a Michael R HAMBLIN. Ultraviolet C irradiation: an alternative antimicrobial approach to localized infections?. *Expert Review of Anti-infective Therapy* [online]. 2014, **10**(2), 185-195 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1586/eri.11.166. ISSN 1478-7210. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.11.166>
- [22] SONG, Kai, Madjid MOHSENI a Fariborz TAGHIPOUR. Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: A review. *Water Research* [online]. 2016, **94**, 341-349 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1016/j.watres.2016.03.003. ISSN 00431354. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135416301300>
- [23] ZHOU, Xiangyu, Isao NAGURO, Hidenori ICHIO a Kengo WATANABE. Mitogen-activated protein kinases as key players in osmotic stress signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2016, **1860**(9), 2037-2052 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.05.032. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030441651630174X>
- [24] KRÄMER, Reinhard. Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *The Chemical Record* [online]. 2010, **10**(4), 217-229 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1002/tcr.201000005. ISSN 15278999. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tcr.201000005>
- [25] WOOD, Janet M. Bacterial responses to osmotic challenges. *The Journal of General Physiology* [online]. 2015, **145**(5), 381-388 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1085/jgp.201411296. ISSN 0022-1295. Dostupné z: <http://www.jgp.org/lookup/doi/10.1085/jgp.201411296>
- [26] BEALES, N. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2004, **3**(1), 1-20 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>
- [27] BRUSLIND, Linda. *Microbiology* [online]. Open Oregon State, 2017 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://open.umn.edu/opentextbooks/textbooks/470/>
- [28] STORZ, Gisela a Regine HENGGE. *Bacterial stress responses*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2011. ISBN 9781555816216.

- [29] SCHUMANN, Wolfgang. Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress and Chaperones* [online]. 2016, **21**(6), 959-968 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1007/s12192-016-0727-z. ISSN 1355-8145. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12192-016-0727-z>
- [30] BOOR, Kathryn J. Bacterial Stress Responses: What Doesn't Kill Them Can Make Them Stronger. *PLoS Biology* [online]. 2006, **4**(1) [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040023. ISSN 1545-7885. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0040023>
- [31] PAGET, Mark. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* [online]. 2015, **5**(3), 1245-1265 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.3390/biom5031245. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2218-273X/5/3/1245>
- [32] BARRIA, C., M. MALECKI a C. M. ARRAIANO. Bacterial adaptation to cold. *Microbiology* [online]. 2013, 159(Pt_12), 2437-2443 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1099/mic.0.052209-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.052209-0>
- [33] SHIVAJI, S. a Jogadheni S. S. PRAKASH. How do bacteria sense and respond to low temperature?. *Archives of Microbiology* [online]. 2010, **192**(2), 85-95 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1007/s00203-009-0539-y. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-009-0539-y>
- [34] BEREZINA, Nathalie, Bopha YADA a Rodrigue LEFEBVRE. From organic pollutants to bioplastics: insights into the bioremediation of aromatic compounds by *Cupriavidus necator*. *New Biotechnology* [online]. 2015, **32**(1), 47-53 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.09.003. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678414021670>
- [35] LADINO-ORJUELA, Guillermo, Eleni GOMES, Roberto DA SILVA, Christopher SALT a John R. PARSONS. Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. DE VOOGT, W.P., ed. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016, s. 105-121 [cit. 2019-03-10]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. DOI: 10.1007/978-3-319-23573-8_5. ISBN 978-3-319-23572-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-23573-8_5
- [36] ARORA, Pankaj Kumar, Alok SRIVASTAVA a Vijay Pal SINGH. Bacterial degradation of nitrophenols and their derivatives. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2014, **266**, 42-59 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.12.011. ISSN 03043894. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389413009345>
- [37] FEYNMAN, Richard Phillips, Matthew SANDS a Robert B. LEIGHTON. *Feynmanovy přednášky z fyziky s řešenými příklady*. Havlíčkův Brod: Fragment, 2001. ISBN 80-7200-420-4.
- [38] HALLIDAY, David, Jearl WALKER a Robert RESNICK. *Fyzika: vysokoškolská učebnice obecné fyziky*. Brno: VUTIUM, 2000. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-214-1868-0.

- [39] ZHANG, Xin. *Biological effects of static magnetic fields*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 978-981-10-3577-7.
- [40] WANG, Huizhen a Xin ZHANG. Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular Sciences*[online]. 2017, **18**(10), 2175- [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.3390/ijms18102175. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2175>
- [41] MOUSAVIAN-ROSHANZAMIR, Sofieh a Ali MAKHDOUMI-KAKHKI. The Inhibitory Effects of Static Magnetic Field on Escherichia coli from two Different Sources at Short Exposure Time. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology* [online]. 2017, **5**(2), 112–116 [cit. 2018-06-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346279/>
- [42] POTENZA, Lucia, Luca UBALDI, Roberta DE SANCTIS, Roberta DE BELLIS, Luigi CUCCHIARINI a Marina DACHÀ. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in Escherichia coli. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2004, **561**(1-2), 53-62 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2004.03.009. ISSN 13835718. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571804001020>
- [43] FILIPIČ, Jasmina, Barbara KRAIGHER, Brigita TEPUŠ, Vanja KOKOL a Ines MANDIC-MULEC. Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria Escherichia coli and Pseudomonas putida. *Bioresource Technology* [online]. 2012, **120**, 225-232 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.06.023. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412009273>
- [44] ROSEN, Arthur D. Mechanism of Action of Moderate-Intensity Static Magnetic Fields on Biological Systems. *Cell Biochemistry and Biophysics* [online]. 2003, **39**(2), 163-174 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1385/CBB:39:2:163. ISSN 1085-9195. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/CBB:39:2:163>
- [45] MIYAKOSHI, Junji. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*[online]. 2005, **87**(2-3), 213-223 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2004.08.008. ISSN 00796107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079610704001117>
- [46] MIHOUB, Mouadh, Alya EL MAY, Amine ALOUI, Abdelwaheb CHATTI a Ahmed LANDOULSI. Effects of static magnetic fields on growth and membrane lipid composition of Salmonella typhimurium wild-type and dam mutant strains. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, **157**(2), 259-266 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.017. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160512002656>
- [47] BAJPAI, Indu, Kantesh BALANI a Bikramjit BASU. Synergistic effect of static magnetic field and HA-Fe₃O₄ magnetic composites on viability of S. aureus and E. coli bacteria. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2014, **102**(3), 524-532 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1002/jbm.b.33031. ISSN 15524973. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.33031>

- [48] BANDARA, H.M.H.N., D. NGUYEN, S. MOGARALA, M. OSIŃSKI a H.D.C. SMYTH. Magnetic fields suppress *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and enhance ciprofloxacin activity. *Biofouling* [online]. 2015, **31**(5), 443-457 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1080/08927014.2015.1055326. ISSN 0892-7014. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2015.1055326>
- [49] JUNKA, A. F., R. RAKOCZY, P. SZYMCZYK, M. BARTOSZEWICZ, P. P. SEDGHIZADEH a K. FIJAŁKOWSKI. Application of Rotating Magnetic Fields Increase the Activity of Antimicrobials Against Wound Biofilm Pathogens. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1), - [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1038/s41598-017-18557-7. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-18557-7>
- [50] FAN, Wei, Zhuo HUANG a Bing FAN. Effects of prolonged exposure to moderate static magnetic field and its synergistic effects with alkaline pH on *Enterococcus faecalis*. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2018, **115**, 117-122 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.028. ISSN 08824010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017312123>
- [51] KARAGULER, Turhan, Hasan KAHRAMAN a Melek TUTER. Analyzing effects of ELF electromagnetic fields on removing bacterial biofilm. *Biocybernetics and Biomedical Engineering* [online]. 2017, **37**(2), 336-340 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.bbe.2016.11.005. ISSN 02085216. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0208521616302066Ss>
- [52] SALYK, Ota, Jaroslav POLCER a František SCHAUER. Mikrovlnný magnetoaktivní zdroj plazmatu. *Československý časopis pro fyziku*. 1992, **42**(1), 66-75.
- [53] MILÉŘOVÁ, Miluše. *Studium odolnosti bakterií vůči vybraným stresovým faktorům*. Brno, 2016, 71 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [54] PÉREZ-PANTOJA, Danilo, Rodrigo DE LA IGLESIA, Dietmar H. PIEPER a Bernardo GONZÁLEZ. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2008, **32**(5), 736-794 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
CFU	kolonii tvořící jednotka
CL	kardiolipin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPG	difosfatidylglycerol
EGFR	„ <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> “
GgpS	glukosylglycerolfosfát syntáza
HSPs	„ <i>heat shock proteins</i> “
mcl PHA	„ <i>medium-chain-length</i> “ polyhydroxyalkanoáty
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
P(3HB)	poly-3-hydroxybutyrát
P(4HB)	poly-4-hydroxybutyrát
P(3HB-co-3HV)	kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu
PE	fosfatidylethanolamin
PG	fosfatidylglycerol
PHA	polyhydroxyalkanoáty
p-NF	p-nitrofenol
RMF	rotační magnetické pole
ROS	reaktivní formy kyslíku
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
scl PHA	„ <i>short-chain-length</i> “ polyhydroxyalkanoáty
SMF	stacionární magnetické pole
UV	ultrafialové (záření)
WT	„ <i>Wild Type</i> “